Konstitutionsaufklärung und Synthese von Rhamnoglucosiden der Flavanon- und Flavonreihe

GEROLD AURNHAMMER

1968

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545804_0105

Dissertations- und Fotodruck Franz Frank
8 München 13, Zieblandstr. 39, Tel. 597 397

Konstitutionsaufklärung und Synthese von Rhamnoglucosiden der Flavanon- und Flavonreihe

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Gerold Aurnhammer

aus

Tutzing

April 1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r

Tag der mündlichen Prüfung: 15.5.1968

INHALTSÜBERSICHT

Seite

EINLEITUNG 1

ALLGEMEINER TEIL 2

I. Strukturaufklärung von Oligosacchariden und Oligosiden 2

Nicht angewandte Methoden 2

1. Perjodatoxidation 2

2. Bleitetraacetatoxidation 7

3. Enzymatische Hydrolyse 8

4. Massenspektrometrie 9

5. Seltener ausgeführte Reaktionen 10

Angewandte Methoden 11

1. Chromatographie und Elektrophorese. 11

2. Hydrolyseverfahren 12

3. Physikalische Messungen 15

4. Permethylierung 16

II. Permethylierung von Glykosiden und Analyse der durch Hydrolyse gewonnenen Methylzucker 18

1. Permethylierung von Disacchariden und Modellglykosiden 18

2. Permethylierung von acetylierten Flavonoidglykosiden im Halbmikromaßstab 23

3. Hydrolyse permethylierter Oligosaccharide und Oligoside 24

4. Identifizierung der Methylzucker mit Hilfe der Papier-, Dünnschicht- und Gaschromatographie . 26

III. Isolierung und Strukturaufklärung eines Isosakuranetin-rhamnoglucosides (Didymin) aus Monarda didyma L. 36

Isolierung 37

Strukturaufklärung 37

Seite

IV. Synthese des Isosakuranetin-rutinosides Didymin 46
1. Synthese des Isosakuranetins 46
2. Synthese von Isosakuranin 49
3. Synthese von Isosakuranetin-7-β-cellobiosid . 50
4. Synthese von Didymin 50
V. Synthese des Naringenin-Rutinosides Narirutin . . 52
1. Synthese von Naringenin-7-β-cellobiosid . . . 52
2. Synthese von Narirutin 53
VI. Synthese des Isosakuranetin-neohesperidosides Poncirin 56
1. Synthese von β-Neohesperidoseheptaacetat und α-Acetobromneohesperidose 57
2. Synthese von Poncirin 58
a) Partielle Methylierung von Naringin zu Poncirin 59
b) Synthese von Poncirin aus Isosakuranetin und α-Acetobromneohesperidose 59
c) Synthese des Poncirin über das Phloroacetophenonglykosid 60
VII. Identitätsbeweis von Acaciin aus Robinia pseudoacacia mit Linarin, einem Acacetin-7-rutinosid aus Linaria vulgaris 65
VIII. Dehydrierung von Flavanon-7-rhamnoglucosiden zu den strukturanalogen Flavonglykosiden 69
1. Überführung von Didymin in Linarin und von Poncirin in Fortunellin 69
2. Überführung von Narirutin in Isorhoifolin . . 73 und von Naringin in Rhoifolin
3. Zur Struktur des Rhoifolins 76
IX. Einfache Unterscheidungsmöglichkeiten von Flavanon-rutinosiden und -neohesperidosiden 80
1. Dünnschichtchromatographie 80
2. Geschmackliche Unterschiede von Rutinosiden und Neohesperidosiden 82

Seite

EXPERIMENTELLER TEIL 84

I. Allgemeine Untersuchungen 84
II. Permethylierung von Glykosiden und Hydrolyse zu Tri- und Tetra-methylhexosen 88
III. Isolierung und Strukturaufklärung eines Isosakuranetinrhamnoglucosides (Didymin) aus Monarda didyma L. 99
IV. Synthese von Glykosiden des Isosakuranetins 106
V. Synthese von Glykosiden des Naringenins 114
VI. Synthese von Acetobromneohesperidose 118
VII. Totalsynthese von Poncirinchalkon und Poncirin . . . 122
VIII. Identität von Acaciin aus Robinia Pseudoacacia L. mit Linarin aus Linaria vulgaris Mill. 127
IX. Dehydrierung der synthetisierten Flavanonglykoside zu den strukturanalogen Flavonglykosiden 130

LITERATURVERZEICHNIS 136

EINLEITUNG

Unter den natürlich vorkommenden Biosiden der Flavanon- und Flavonreihe sind die Rhamnoglucoside am häufigsten vertreten. Neben den Flavonol-rhamnoglucosiden, unter ihnen das bekannte Rutin, stellen vor allem die Flavanon-7-O-rhamnoglucoside eine therapeutisch interessante Gruppe dar. Das dazu gehörende Hesperidin z.B. besitzt Vitamin P-Charakter. Interessanterweise dauerte es über 100 Jahre, bis die Struktur dieses Bioflavonoides exakt geklärt und synthetisch bewiesen war. Ähnlich verhält es sich mit den anderen Flavonoidbiosiden, die bis heute bekannt geworden sind. Der Grund hierfür war das Fehlen geeigneter Analysenverfahren für die verschiedenen Disaccharide, von denen es mehrere Strukturisomere gibt.

Bei Rhamnoglucosiden liegt der Zuckeranteil in der Regel als Rutinose (6-O-α-L-Rhamnopyranosyl-D-glucopyranose) oder als Neohesperidose (2-O-α-L-Rhamnopyranosyl-D-glucopyranose) vor. Von den beiden anderen möglichen isomeren Rhamnoglucosiden wurde in jüngster Zeit die 4-O-α-L-Rhamnopyranosyl-D-glucopyranose als Bestandteil eines Flavanonglykosides aufgefunden.

Aufgabe dieser Arbeit sollte es sein, die Struktur des Zuckeranteiles in den noch nicht exakt analysierten, natürlich vorkommenden Rhamnoglucosiden aufzuklären sowie für noch nicht synthetisierte Flavanonrhamnoglucoside und die analogen Flavonbioside den endgültigen Strukturbeweis durch die Synthese zu liefern.

A L L G E M E I N E R T E I L

I. STRUKTURAUFKLÄRUNG VON OLIGOSACCHARIDEN UND OLIGOSIDEN

Unter Oligosiden versteht man nach KOCHETKOV[1] natürlich vorkommende Glykoside, deren Zuckeranteil aus zwei oder mehreren (bis ca. 10) Monosaccharideinheiten zusammengesetzt ist. Die wichtigsten Methoden zur Strukturanalyse von Oligosiden und Oligosacchariden sind:

Chromatographie und Elektrophorese
Totale und partielle Hydrolyse
Permethylierung
Physikalische Messungen (IR, UV, KMR, OR)
Massenspektrometrie
Perjodatoxidation
Bleitetraacetatoxidation und
Enzymatische Hydrolyse

Welche der zahlreichen Methoden zur Strukturanalyse von Oligosacchariden angewendet werden soll, richtet sich in erster Linie nach der zur Verfügung stehenden Substanzmenge und auch nach der vermuteten Größe des Oligosaccharidrestes. In letzter Zeit haben vor allem physikalische Methoden, wie die KMR-Spektroskopie und auch die Massenspektrometrie an Bedeutung zugenommen. Nachstehend sollen einige der wichtigsten Verfahren, soweit sie zur Konstitutionsermittlung von Oligosacchariden von Bedeutung sind, beschrieben werden.

1. PERJODATOXIDATION

Perjodsäure spaltet C-C-Bindungen von Polyhydroxyverbindungen mit 1,2-Glykolteilstruktur und wird dabei zu Jodsäure reduziert. Dieses von MALAPRADE[2] eingeführte Reagens eignet sich zur Strukturbestimmung von Glykosiden und Oligo- bzw. Polysacchariden.

Die C-C-Bindung zwischen zwei benachbarten, mit Hydroxylgruppen substituierten C-Atomen wird gespalten. Die Hydroxylgruppen werden dabei zu Carbonylgruppen oxidiert. Aus primären Hydroxylgruppen entsteht Formaldehyd, aus sekundären entsteht Ameisensäure (Gleichung 1).

1. $CH_2OH-(CHOH)_n-CH_2OH \xrightarrow{HJO_4} n\ HCOOH + 2\ HCHO$

Die Menge an verbrauchtem Perjodat wird titrimetrisch bestimmt. Auch durch Bestimmung der Anzahl der entstandenen Mol Ameisensäure und Formaldehyd lassen sich Rückschlüsse auf die Natur der glykosidischen Bindungen im Oligosaccharid ziehen. Bei der Auswertung der Ergebnisse der Perjodatoxidation gelten einige Vorbehalte. Es gibt zahlreiche Fälle, in denen die gemessenen Werte keine Rückschlüsse auf die wirkliche Struktur des Oligosaccharides zulassen. Der Grund kann verschiedener Art sein: Komplikation der Oxidation durch Formylesterbildung, Überoxidation zu Kohlendioxid oder auch unvollständige Oxidation durch sterische Behinderung. Daher sollten die erzielten Ergebnisse durch Untersuchung der Spaltprodukte nach Hydrolyse der Oligo-aldehydverbindung gesichert werden. Die Acetal- und Halbacetalbindungen in Oligo-(oder Poly-)sacchariden werden durch Perjodat nicht gespalten. Daher entsteht aus dem Oligosaccharid stets eine Oligoaldehydverbindung.

Um diese Oligoaldehydverbindung durch Umwandlung in Derivate zu stabilisieren, kann man die Aldehydverbindungen entweder hydrolytisch zu Säuren oxidieren oder die Aldehydgruppen zu alkoholischen Gruppen reduzieren und dann sauer hydrolysieren. Bei der ersteren Methode wird die Hydrolyse mit verdünnter Salpetersäure durchgeführt. HUDSON u. Mitarb.[3] erhielten auf diese Weise zweibasische Säuren. Bei der Natriumborhydridreduktion nach SMITH[4] werden durch Reduktion der Carbonylgruppen stabile Oligo-(Poly-)alkohole erhalten, die sich mit Säure leichter hydrolysieren lassen als die Oligoaldehydver-

bindungen. Die Isolierung und Identifizierung der entstehenden Verbindungen erlaubt einen direkten Beweis für die Struktur einiger Teile von Kohlehydratketten. Dabei entsteht aus den Glucoseeinheiten eines regelmäßig gebauten Oligosaccharides, was die innerständigen Glucosemolekeln anbelangt, ein charakteristisches Hydrolyseprodukt:
Glucoseeinheiten mit 1 ⟶ 2 Verknüpfung, die also benachbarte Hydroxylgruppen am C_3 und C_4 enthalten, ergeben G l y c e r i n .

Glucoseeinheiten mit 1 ⟶ 3 Verknüpfung, die also keine benachbarten Hydroxylgruppen enthalten, sind durch Perjodat nicht angreifbar. Nach Hydrolyse entsteht daher G l u c o s e .

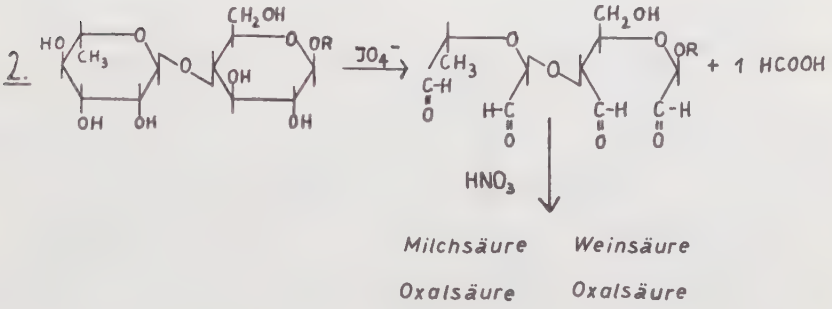
Glucoseeinheiten mit 1 ⟶ 4 Verknüpfung, die also benachbarte Hydroxylgruppen am C_2 und C_3 enthalten, ergeben E r y t h r i t .

Glucoseeinheiten mit 1 ⟶ 6 Verknüpfung, die also drei benachbarte Hydroxylgruppen enthalten, eliminieren primär ein Mol Ameisensäure. Sie ergeben G l y c e r i n .

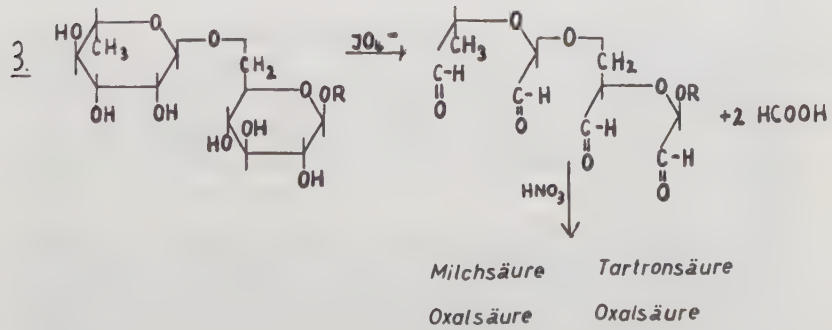
Die Identifizierung der Alkohole erfolgt mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie auf Silicagelplatten. Nach Acetylierung - sie kann, wie BISHOP[5] berichtet, vorteilhaft durch Acetolyse des Oligoalkoholes erreicht werden - lassen sich die Alkoholacetate auch gaschromatographisch trennen. Durch Ausmessen der Peaks läßt sich gleichzeitig eine quantitative Bestimmung durchführen. Es ist naheliegend, daß bei unverzweigten, längeren Kohlehydratketten mit unterschiedlicher Verknüpfungsweise auch der Abbau nach SMITH[4] nur eine begrenzte Auskunft gibt, da nur 1 ⟶ 3 gebundene Zucker der Oxidation nicht ausgesetzt sind.

Bei O-Glykosiden, die ein Disaccharid als Zuckerkomponente enthalten, wurde die Perjodatspaltung bisher bereits mehrmals angewendet. So wurde z.B. die Perjodatoxidation kürzlich von SERGIENKO und Mitarb.[6] bei dem Flavonoidglykosid Atsinosid, einem Isosakuranetin-7-rhamnosido- (1 ⟶ 4) glucosid durchgeführt (Gleichung 2). Der dabei gebildete Te-

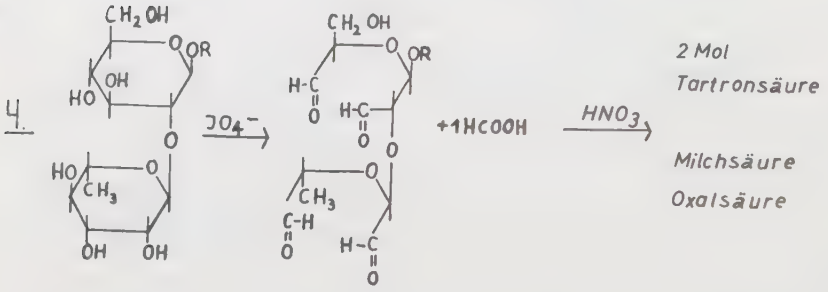
traaldehyd wurde durch oxidative Hydrolyse mit 20% Salpetersäure zu W e i n s ä u r e , Milchsäure und 2 Mol Oxalsäure abgebaut.



Rutin, ein Quercetin-3-rhamnosido- (1 ⟶ 6)glucosid (Gleichung 3) läßt sich so spalten, daß neben 2 Mol Ameisensäure ein Tetraaldehyd entsteht, der zu T a r t r o n s ä u r e , Milchsäure und 2 Mol Oxalsäure abgebaut werden kann.



Naringin, ein Naringenin-7-rhamnosido- (1 ⟶ 2)glucosid (Gleichung 4), ergibt bei der Spaltung neben 1 Mol Ameisensäure einen Tetraaldehyd, der zu 2 Mol T a r t r o n s ä u r e , Milchsäure und Oxalsäure abgebaut wird.



Bei Anwendung der Methode nach SMITH[4] kann analog der wie bei Atsinosid, Rutin oder Naringin erhaltene Tetraaldehyd mit Natriumborhydrid zum entsprechenden Alkohol reduziert werden. Nach Hydrolyse mit verdünnter Salzsäure erhält man charakteristische Spaltprodukte.

Aus Atsinosid kann neben Glykolaldehyd und dem aus Rhamnose entstehenden Propandiol E r y t h r i t dargestellt werden. Aus Rutin kann entsprechend Glykolaldehyd, Propandiol und G l y c e r i n und aus Naringin neben Glykolaldehyd und Propandiol G l y c e r i n und G l y c e r i n a l d e h y d erhalten werden.

Während die Zahl der auf diese Weise untersuchten Flavon-O-bioside bisher noch gering ist, hat die Methode bei den Flavon-C-glykosiden umso größere Anwendung gefunden. Bei diesen ist die Perjodatspaltung sogar unentbehrlich, da die Zucker durch einfache Säurehydrolyse nicht abgespalten werden können.

2. BLEITETRAACETATOXIDATION

Diese von CRIEGEE[7] entwickelte Methode ist eng verwandt mit der Perjodatoxidation. Auch hier wird stets eine 1,2-Glykolgruppe angegriffen. Die Bestimmung des Bleiverbrauchs erfolgt im allgemeinen jodometrisch. Cis-Glykole werden in der Regel wesentlich rascher angegriffen als Trans-Glykole. Je näher die benachbarten Hydroxylgruppen in einer Ebene liegen, um so rascher erfolgt die Spaltung durch Bleitetraacetat.

Bemerkenswert sind Spaltungsreaktionen bei einigen Poly- und Oligosacchariden. Bei Oligosacchariden mit 1 ⟶ 4 Verknüpfung, so z.B. im 4-O-Mannopyranosyl-cellobiosid, werden nur die beiden Endzucker oxidativ zwischen dem C_2-und dem C_3-Atom gespalten[8]. Mittelständige Glucoseeinheiten (hier: Glucose) bleiben unangegriffen. Reduktion des entstandenen Produktes und nachfolgende Hydrolyse liefert entsprechend zwei Alkohole und ein bis n-2 Mol Glucosen (in unserem Beispiel also Glycerin, Erythrit und Glucose). In aromatischen Oligosiden gleicher Natur wird nur noch eine Spaltung am endständigen Zucker erreicht. PERLIN[8] zeigte auf, daß die Molekülgröße der Substituenten dieser ungespaltenen Zucker entscheidend ist. Eine C_6-$H_x$$O_x$-Einheit, wie z.B. ein Phenyl-, ein Benzyl- oder auch ein Glucosylrest, der mit der reduzierenden Gruppe eines Disaccharides vom 1 ⟶ 4 Typ glykosidisch gebunden ist, verhindert die Bleitetraacetatspaltung an diesem reduzierenden Zucker. Bei Substituenten mit kleinem Molekulargewicht am C_1 und C_4 (z.B. Methyl-4-O-methyl-glucosid) beobachtete PERLIN[9] dagegen die erwartete Spaltung an der C_2 - C_3-Bindung. Damit ist eine einzigartige Methode zum stufenweisen Abbau solcher Verbindungstypen gegeben.

Wegen dieser sehr selektiv verlaufenden Spaltungen hat sich die Bleitetraacetatoxidation speziell zum Abbau von Di- und Tri-sacchariden unbekannter Konfiguration zu Glykosylglycerolen bekannter Struktur und bekannter Konfiguration bestens bewährt (z.B. Maltose ⟶ 2-O-β-D-Glucopyranosyl-glyceritol).

Damit bietet sich eine chemische Methode zur Konfigurationsbestimmung von glykosidischen Bindungen an. Strukturanalysen mit Hilfe der Bleitetraacetatoxidation wurden bei Oligo- und Poly-sacchariden, jedoch nur selten bei Oligosiden durchgeführt.

3. ENZYMATISCHE HYDROLYSE

Die enzymatische Hydrolyse ist die klassische Methode zur Konfigurationsbestimmung von glykosidischen Bindungen. Doch wurde in jüngster Zeit ein Beispiel beschrieben, daß eine hochgereinigte β-Galactosidase auch ein α-verknüpftes Glykosid glatt zu hydrolysieren vermag. Die alleinige Konfigurationsbestimmung auf Grund enzymatischer Hydrolyse hat daher keine absolute Aussagekraft. Wie auf S. 13 dieser Arbeit näher beschrieben, eignet sich die enzymatische Hydrolyse gut zur partiellen Hydrolyse von Oligosiden und Polysacchariden.

4. MASSENSPEKTROMETRIE

In den letzten Jahren wurde die Massenspektrometrie in ständig steigendem Maße zur Strukturuntersuchung organischer Verbindungen herangezogen. Im Massenspektrometer wird das im Gaszustand befindliche Molekül durch Stoßionisation so stark angeregt, daß es in positiv geladene und neutrale Bruchstücke zerfällt. Ihre Trennung erfolgt im Magnetfeld auf Grund ihrer unterschiedlichen Massenzahlen.

Die Massenspektrometrie wurde 1958 durch REED[11] erstmals bei Kohlehydratderivaten angewendet. In den letzten Jahren wurden die Untersuchungen intensiviert. Eine ausführliche Übersicht über die Fortschritte der Massenspektrometrie auf dem Gebiet der Kohlehydratderivate bis 1966 geben KOCHETKOV und CHIZHOV[12]. Besondere Vorteile bringt die Massenspektrometrie bei Strukturanalysen von Monosacchariden. So gelingt es z.B. gut, Aldosen von Ketosen, Pyranoside von Furanosiden, cyclische Zucker von acyclischen Monosacchariden oder auch Pentosen von Hexosen zu

unterscheiden. Zwei weitere Anwendungsmöglichkeiten der Massenspektrometrie dürften in Zukunft einen entscheidenden Anteil auf dem Gebiet der Strukturaufklärung von Oligo- und Polysacchariden erlangen. Es sind dies das Gebiet der partiell methylierten Monosaccharide[13] und die direkte Strukturanalyse der Trimethylsilylderivate von Disacchariden. KOCHETKOV und CHIZHOV[14)15] untersuchten alle ihnen zur Verfügung stehenden Methylhexosen und Methylpentosen und stellten die Daten der Massenspektren in Tabellen zusammen. Darüber hinaus dehnten sie ihre Untersuchungen auf die Trimethylsilylderivate von Mono- und Di-sacchariden aus.

Zur Identifizierung p a r t i e l l m e t h y l i e r t e r M o n o s a c c h a r i d e wird das Permethylderivat der zu untersuchenden Verbindung methanolysiert und das Gemisch der entstandenen Methylglykoside auf herkömmliche Weise (z.B. gaschromatographisch) getrennt. Die einzelnen Methylglykoside werden mit Trideuteromethyljodid alkyliert. Man erhält so permethylierte Monosaccharide, in denen die bei der Methanolyse des Ausgangsmaterials entstandenen Hydroxylgruppen der Monosaccharide durch Trideuteromethylgruppen substituiert sind. Zur Analyse wird in der Regel etwa 1 mg Substanz benötigt. Allgemein wird im Massenspektrum die Zahl und die Position der im Permethylglykosid enthaltenen Trideuteromethylgruppen bestimmt. Dies geschieht durch Vergleich des erhaltenen experimentellen Spektrums mit Standardspektren bekannter Verbindungen. Als Bezugssubstanz ist lediglich das entsprechende, leicht darstellbare permethylierte Trideuteromethylmonosaccharid zu untersuchen. Die Daten der erhaltenen Spektren sind für ein und dieselbe Verbindung - im Unterschied zur Chromatographie - stets exakt reproduzierbar. Um also beispielsweise eine Trimethylglucose zu identifizieren, ist keine der vier möglichen Glucopyranosen als Testsubstanz nötig. Die authentischen, von KOCHETKOV[14] aufgestellten Tabellen zeigen, daß diese Trimethylglucosen nach Trideuteromethylierung auf Grund unterschiedlicher Massenspektren sicher unterschieden werden können.

5. SELTENER AUSGEFÜHRTE REAKTIONEN

Als weitere, begrenzte Möglichkeiten zur Strukturermittlung seien genannt:

Der alkalische Abbau [16] von reduzierenden Aldosen.
Schwache Alkalien ergeben Epimerisierung (Lobry-de-Bruyn Umwandlung). Aus Glucose wird beispielsweise durch Kalkwasser die epimere Mannose. Stärkere Alkalien ergeben zuerst die Bildung von Ketosen (Glucose ⟶ Fruktose), dann von niederen Polyhydroxyketosen und Formaldehyd. 1 ⟶ 3 gebundene Disaccharide aus zwei Hexosen (Laminaribiose) werden durch Alkali zerstört.

Die cuprimetrische Oxidation [17] dient zur Erfassung von vicinalen Hydroxylgruppen durch Komplexbildung.

Oxidation mit Hypochlorit [16] eliminiert aus Hexosen ein C-Atom (Maltose ⟶ 3-α-Glucosylarabinose).

Osazone lassen sich durch Erhitzen mit Phenylhydrazin darstellen. Die Osazonbildung am reduzierenden Zucker versagt, wenn die C_2-Hydroxylgruppe bereits substituiert ist.

Natriumborhydrid [16] reduziert selektiv den reduzierenden Endzucker eines Oligosaccharides. Nach Hydrolyse erhält man die freien Monosaccharide und den gesuchten Zuckeralkohol.

Methoden zur Konstitutionsermittlung von Oligosacchariden, die in dieser Arbeit angewandt wurden:

1. CHROMATOGRAPHIE UND ELEKTROPHORESE

Der Vorteil der chromatographischen Methoden liegt in ihrer hohen Empfindlichkeit. Weniger als 1 mg Substanz wird zur Chromatographie benötigt. Die ersten Verfahren bedienten sich der Papierchromatographie und der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten.

Die P a p i e r e l e k t r o p h o r e s e von Mono- und Disacchariden im komplexbildenden Boratpuffer wurde 1952 von JANICKE[18] eingeführt. RÖSLER[19] trennte hiermit beispielsweise die fünf isomeren Glucosylglucosen Gentiobiose, Laminaribiose, Maltose, Cellobiose und Sophorose. Auch die Elektrophorese von Glykosiden ist möglich. GENTILI u. HOROWITZ[20] beschrieben die Papierelektrophorese von Flavanon-rutinosiden und -neohesperidosiden im Boratpuffer. Die Rutinoside wanderten dabei langsamer als die Neohesperidoside.

Besonders leistungsfähig ist auch die G a s c h r o m a t o g r a p h i e . SWEELEY u. Mitarb.[21] berichteten erstmals 1963 über die gaschromatographische Trennung von freien Zuckern in Form ihrer Trimethylsilylderivate. Auf diese Weise lassen sich Mono- und Disaccharide identifizieren. Auch in Form ihrer Acetate[22] können Zucker gaschromatographisch getrennt werden. Nach präparativer Gaschromatographie können in beiden Fällen die freien Zucker nach milder Hydrolyse leicht zurückgewonnen werden.

S p r ü h r e a g e n t i e n . Neben den bisher üblichen Standardreagentien, wie Anilinhydrogenphthalat, Naphtoresorcin oder Silbernitratlösung gibt es einige spezifische Reagentien.

a) Triphenyltetrazoliumchlorid
Das Reagens wird nach WALLENFELS[23] von reduzierenden Zuckern in alkalischer Lösung zum tiefroten Triphenylformazan hydrolysiert. Reduzierende Disaccharide ergeben nur

dann eine positive Farbreaktion, wenn die Hydroxylgruppe am C_2 frei ist. 1 ⟶ 2 verknüpfte Disaccharide, wie z.B. Sophorose, ergeben daher eine negative Farbreaktion.

b) Diphenylamin-Anilin nach BAILEY[24]
Dieses Reagens gibt mit Disacchariden, die in 4-Position der reduzierenden Monosaccharidkomponente glykosidisch gebunden sind (wie z.B. Lactose), eine spezifische hellblaue Farbe. Andere Disaccharide werden gelbbraun oder grau angefärbt.

2. HYDROLYSEVERFAHREN

Die t o t a l e Hydrolyse von Oligosiden und Zuckern mit Mineralsäure gelingt im allgemeinen ohne große Schwierigkeiten. Die qualitative Zusammensetzung des erhaltenen Monosaccharidgemisches wird durch chromatographische Standardverfahren bestimmt. Die quantitative Abschätzung wird meistens durch Densitometrie der Chromatogramme ausgeführt. Da sich aber unter den bei höheren Oligosiden und Polysacchariden nötigen, drastischen Hydrolysebedingungen Monosaccharide teilweise zersetzen (z.B. Rhamnose), kann das genaue Monosaccharidverhältnis auf diesem Weg nicht ermittelt werden. Eine schonende Totalhydrolyse nach KILIANI[25] (10 ml konz.Salzsäure, 35 ml Eisessig, 55 ml Wasser) liefert bei quantitativer Auswertung bessere Ergebnisse.

Die p a r t i e l l e saure Hydrolyse und auch die Acetolyse von Oligosiden und Polysacchariden ist für eine Strukturermittlung von großer Bedeutung. Von Einfluß auf die partielle Hydrolyse ist die Art der Zuckerverknüpfung der Monosaccharideinheiten. Nach TIMELL[26] werden 1 ⟶ 2 verknüpfte Glucoseeinheiten (Typ: Sophorose) rascher und leichter hydrolysiert als solche mit 1 ⟶ 4 Verknüpfung (Typ: Cellobiose). Letztere wiederum spalten wesentlich rascher als 1 ⟶ 6 verknüpfte Glucoseeinheiten (Typ: Gentiobiose). Auch die verschiedene Konfiguration isomerer Zuckereinheiten ist von Einfluß. Bei

Glykosiden spielt darüberhinaus Größe des Aglykons und Elektrophilie seiner Substituenten eine gewisse Rolle. Der Verlauf der partiellen Hydrolyse ist bei mehreren gegebenen Monosaccharideinheiten theoretisch meist nicht vorauszusehen.

Für die Durchführung von Hydrolysen finden die verschiedensten Agentien Verwendung. Erwähnt seien die Hydrolyse mit v e r d ü n n t e r M i n e r a l s ä u r e . So gelang es (PERCHERON[27]) Sophorose aus einem Quercetinglykosid mit 0.04 n Schwefelsäure abzuspalten.

Mit s a u r e n I o n e n a u s t a u s c h e r n spaltete LIST[28] aus Rutin Rhamnose ab.

Die e n z y m a t i s c h e H y d r o l y s e von Polysacchariden gibt meist andere Zusammensetzung und bessere Ausbeuten an Oligosacchariden als die saure Hydrolyse, wenn nach PAINTNER[29] im Dialysierverfahren gearbeitet wird. Die partiellen Bruchstücke können so kontinuierlich entfernt werden, bevor sie zu Monosacchariden abgebaut werden. Es ist weiterhin möglich, aus Oligosiden mit spezifischen Enzymen den endständigen Zucker abzuspalten oder auch speziell die Bindung am Aglykon zu lösen. So läßt sich das Disaccharid Rutinose aus Rutin mittels eines Enzymes aus den Samen von Rhamnus utilis intakt abspalten (CHARAUX [30]).

O r g a n i s c h e S ä u r e n , wie z.B. Ameisensäure in Cyclohexanol spalten aus Glykosiden häufig den Endzucker ab. Weiterhin werden verdünnte Oxalsäure oder verdünnte Essigsäure verwendet. ZEMPLEN[31] gelang auf diese Weise die Abspaltung von Rutinose aus Rutin.

Peracetylierte Oligoside lassen sich durch A c e t o l y s e m i t B r o m w a s s e r s t o f f - E i s e s s i g in Bruchstücke spalten, die nach Entacetylierung als freie Di- und Oligosaccharide erhalten werden. TSCHESCHE[32] erhielt so aus Digitonin Mono- bis Tetrasaccharide.

Die Abspaltung von Rhamnosidoglucosen aus Flavonoiden gelang CHANDLER u. HARPER[33] mit Hilfe von Wasserstoffperoxid und Kaliumpermanganat.

Auch die Abspaltung eines Disaccharides aus Glykosiden durch Einwirken von Ozon in Eisessig wurde wiederholt mit Erfolg durchgeführt. ZEMPLEN und BOGNAR[34] erhielten so aus Rutin Rutinose.

Die alkalische Hydrolyse wird bei Kohlehydraten selten durchgeführt. Während - wie oben erwähnt - reduzierende Zucker durch Alkali abgebaut werden, sind Glykoside und Polysaccharide im allgemeinen alkalistabil. Dies gilt nicht für Derivate von 1 ⟶ 3 verknüpften Aldohexosen (Typ: Laminaribiose, Nigerose). Laminarin, ein Poly-D-glucosan mit 1 ⟶ 3 Verknüpfung, wird durch Einwirken von 2 n Natronlauge bei 40° in wenigen Minuten aufgespalten.

Viele Aryloxy-glykoside sind gleichfalls alkaliempfindlich[35]. Beispielsweise geben Phenyl-β-D-glucosid sowie Apigenin-7-β-D-glucosid in der Siedehitze mit Laugen 1,6-Anhydro-β-D-glucopyranose. Dabei entsteht intermediär 1,2-Anhydroglucose. Ist jedoch das C_2-Hydroxyl des Zuckers substituiert, wie in 2,3-Di-O-methyl-β-D-glucopyranosid oder in Naringenin-7-β-(2-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid) (Naringin)[36], so ist die glykosidische Bindung auch in der Hitze völlig alkalistabil. Eine Erklärung hierfür liefert McCLOSKEY[37]: Aromatische Glykoside, die am C_2-Atom der Glucose eine Hydroxylgruppe tragen, die in trans - Stellung zur benachbarten Aryloxygruppe steht, werden in Alkalien unter Bildung von 1,2-Anhydroglucose angegriffen. Diese wird unter Alkalieinfluß schnell weiter zu 1,6-Anhydroglucopyranose isomerisiert. Eine Ionisation der transständigen C_2-Hydroxylgruppe verdrängt die Aryloxygruppe vermutlich durch nukleophile Substitution. Da 1,6-Anhydroglucopyranose als Endprodukt auftritt, wird nach BALLOU[35] doppelte WALDEN-Umkehr angenommen.

Der Alkaliabbau von Flavonoid-7-glykosiden, die mit einem Disaccharid in β-Stellung glykosidiert sind, ist daher ein Hilfsmittel zur Strukturermittlung der Biose. Dabei entsteht durch Spaltung des γ-Pyronringes eine organische Säure und ein Acetophenonderivat. Die glykosidische Bindung am Acetophenonderivat wird durch Alkalien stets dann hydrolysiert, wenn die C_2-Hydroxylgruppe des mit dem Aglykon verknüpften Glucosemoleküls unsubstituiert und transständig zur benachbarten Aryloxygruppe ist[36]. Ein Acetophenon-disaccharid bleibt dagegen bei 1 ⟶ 2-Verknüpfung der Biose ungespalten. Im Falle des oben erwähnten Naringins erhält man daher Phloroacetophenon-4-neohesperidosid.

3. PHYSIKALISCHE MESSUNGEN

Optische Rotation

Zur Bestimmung der Konfiguration von Glykosiden eignet sich neben der enzymatischen Hydrolyse und der Bleitetraacetatoxidation die Messung der optischen Drehung.

Für bis zu vier Monosaccharidreste enthaltende Oligoside gelingt es, die Konfiguration durch Berechnung aus den Drehwerten nach KLYNE[38] zu bestimmen. KLYNE's Regel besagt, daß die molekulare Drehung eines Glykosides, dem ein optisch aktives Aglykon zugrunde liegt, der Summe der molekularen Drehungen des Aglykons und des entsprechenden α- oder β-Methylglykosides entspricht. Diese Regel ist auch auf Oligosaccharide anwendbar. Bei höheren Oligosiden gibt das Verfahren keine sicheren Hinweise auf die Konfiguration.

Infrarotspektroskopie

Die IR-Spektroskopie ist ein wichtiges Hilfsmittel zur Konstitutionsaufklärung und zum Identitätsnachweis. Nicht nur funktionelle Gruppen werden durch charakteristische Peaks angezeigt, auch ein Hinweis auf die Konfiguration einer glykosidischen Bindung kann aus einem IR-Spektrum entnommen werden. In Flavonoid-7-rhamnoglucosiden spricht beispielsweise eine

Bande bei 835 cm^{-1} für das Vorliegen einer α-glykosidischen Bindung. Über die Aussagemöglichkeiten dieser Methode auf dem Gebiet von Oligosacchariden und Oligosiden berichtet SPEDDING[39] in seiner Arbeit "IR-Spektroskopie and Carbohydrate Chemistry".

Kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie

Die Kernresonanzspektroskopie von Disacchariden und Glykosiden mit Biosidkomponenten spielt heute bei der Strukturaufklärung der Zucker eine entscheidende Rolle. Die Substanzen - man benötigt je nach Molekulargewicht etwa 10 bis 100 mg - werden in geeigneten Lösungsmitteln (z.B. DMSO) untersucht. Entscheidende Aussagen lassen sich auch aus den Spektren der Glykosidacetate und der Trimethylsilylderivate machen. Einen ausführlichen Überblick über Wesen und Möglichkeiten der kernmagnetischen Resonanz auf dem Gebiet der Kohlehydrate vermittelt HALL[40] in seiner Arbeit "Nuclear Magnetic Resonance". In Flavonoidglykosiden kann - wie RÖSLER u. Mitarb.[85] aufzeigten - auf Grund charakteristischer Signale eine axiale oder aequatoriale Lage des Zuckers, also seine α- oder β-Verknüpfung erkannt werden. Auch die Unterscheidung von isomeren Biosiden gelingt mit Hilfe der KMR-Spektroskopie, wie RÖSLER[85] und MABRY[135] am Beispiel von Rutinosiden und Neohesperidosiden demonstrierten. Uns gelang mit Hilfe dieser modernen physikalischen Methode ein Strukturbeweis für Didymin (siehe Abschnitt III,S.43 dieser Arbeit).

4. PERMETHYLIERUNG

In Analogie zur Äthersynthese von Williamson haben vor allem PURDIE und IRVINE[41] (1903) sowie HAWORTH[42] und sein Arbeitskreis Methoden zur Permethylierung von Kohlehydraten und Glykosiden entwickelt. Im allgemeinen waren mehrere aufeinanderfolgende Methylierungen und daher größere Substanzmengen erforderlich, um alle Hydroxylgruppen zu veräthern. Es wurden verschiedentlich Verbesserungen vorgeschlagen, doch erst die Verfahren von KUHN u. Mitarb.[43] (1955) brachten eine entscheidende Verbesserung.

Die Purdie-Methylierung wird mit Methyljodid und Silberoxid, die Haworth-Methylierung mit Natronlauge und Dimethylsulfat durchgeführt. KUHN benutzte als Lösungsmittel Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid. Statt Natronlauge wird bei der Kuhn-Methylierung meist Bariumoxid und Bariumhydroxid verwendet. Als Agens dient Methyljodid oder Dimethylsulfat. WALLENFELS, KUHN u. Mitarb.[44] beschreiben 1963 verschiedene Abwandlungen dieser Methode.
Die Identifizierung der einzelnen Methylzucker, die nach Hydrolyse der permethylierten Produkte erhalten werden, erfolgt bei größeren Substanzmengen durch Isolieren der einzelnen Methylzucker. Der Schmelzpunkt und die optische Drehung der Reinsubstanz dienen als Charakteristika.

Seit Anwendung der Chromatographie können auch kleinste Mengen von Methylzuckern analysiert werden. Papier- und dünnschichtchromatographisch lassen sich z.B. alle 4 isomeren Trimethylglucopyranosen voneinander trennen. Noch eleganter gelingt die Trennung der Methylzucker in Form ihrer Methylglykoside mit Hilfe der Gaschromatographie.

Endlich können durch präparative Chromatographie erhaltene Methylzucker durch massenspektrometrische Analyse strukturell aufgeklärt werden.

II. PERMETHYLIERUNG VON GLYKOSIDEN UND ANALYSE DER DURCH HYDROLYSE GEWONNENEN METHYLZUCKER

1. Permethylierungen von Disacchariden und Modellglykosiden

a) Darstellung von Methyl-hepta-O-methyl-disacchariden

Zur Gewinnung von Test-Methylzuckern methylierten wir verschiedene Disaccharide nach den von KUHN u.Mitarb.[44] vorgeschlagenen Methoden. Während man früher bei Methylierungen im allgemeinen von den nichtreduzierenden Methylglykosiden ausgehen mußte, erlaubt die KUHN'sche Methode die direkte Methylierung der Zucker, da deren reduzierende Gruppe praktisch keiner Oxidation ausgesetzt ist. Wir methylierten daher in einem Schritt die Disaccharide M a l t o s e und M e l i b i o s e . Im Falle der S o p h o r o s e gingen wir von dem Methylglykosid der Heptaacetylsophorose aus. C e l l o b i o s e wurde als Octaacetat methyliert.

Zur Darstellung von M e t h y l - h e p t a - O - m e t h y l - m a l t o s i d , einem erstmals von HAWORTH u. LEITCH[45] erhaltenen hellgelben Sirup, benutzten wir DMF und DMSO als Lösungsmittel und Bariumhydroxid sowie Bariumoxid als basische Katalysatoren. Als Methylierungsmittel diente frisch destilliertes Dimethylsulfat. Die Beendigung der Reaktion wurde durch laufende chromatographische Analyse kleiner Proben festgestellt. Anschließend wurde überschüssiges Dimethylsulfat durch Ammoniakzusatz zerstört.

Die Reaktionszeit ist stark temperaturabhängig. Bei tiefer Temperatur (+ 4°) erfolgt stundenlang keine Methylierung. Sie führt dann aber nach einer gewissen Induktionsperiode ziemlich rasch zu hohen Methoxylwerten. Bei einer Temperatur von etwa 40° gelingt nach KUHN[46] die Permethylierung dagegen schon in wenigen

Stunden. KUHN zeigte ferner, daß für das Gelingen einer möglichst quantitativen Permethylierung auch die Menge des Lösungsmittels entscheidend ist. Verwendete KUHN[46] nur doppelt soviel DMF als der ermittelten optimalen Menge entsprach, so erhielt er im Falle der Octamethyllactose eine fünfmal geringere Ausbeute. Nach KORNBLUM[47] spielen Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid vermutlich bei der Methylierung nicht nur als Lösungsmittel, sondern auch als zusätzliche Katalysatoren eine Rolle.

M e t h y l - h e p t a - O - m e t h y l - m e l i b i o s i d stellten wir aus Melibiose-monohydrat in 70% Ausbeute mit Methyljodid als Alkylierungsmittel dar. Die in langen farblosen Nadeln erhaltene Permethylmelibiose wurde erstmals von HAWORTH u. Mitarb.[48] dargestellt. Es erwies sich als vorteilhaft, Bariumoxid und Bariumhydroxid im Verhältnis 25:1 anzuwenden. Durch Zusatz von wasserbindendem Calciumsulfat (Drierite) konnte die Ausbeute verbessert werden. Die Reaktionsdauer dieser Methylierungsmethode ist wesentlich kürzer als die der oben beschriebenen Methode mit Dimethylsulfat. So läßt sich Lactose nach KUHN[46] bei 40° schon in etwa 30 Minuten permethylieren.

Cellobioseoctaacetat ließ sich ohne Zusatz von DMSO mit Dimethylsulfat in DMF und gleichen Mengen an Bariumoxid und Bariumhydroxid in ausgezeichneter Ausbeute permethylieren. Die im Verlauf der Reaktion frei gewordene Essigsäure wurde als Bariumacetat gebunden. Das kristallin erhaltene M e t h y l - h e p t a - O - m e t h y l - c e l l o b i o s i d wurde von HAWORTH u. HIRST[49] erstmals dargestellt.

Das M e t h y l - h e p t a - O - m e t h y l - s o p h o r o s i d - unseres Wissens bisher noch nicht beschrieben - konnten wir in 85% Ausbeute kristallin erhalten.

Die dargestellten Permethylzucker stellen eine Mischung aus α- und β-Methylglykosiden dar. Wie chromatographische Untersuchungen ergaben, entstanden jeweils mehr β-Glykoside als α-Glykoside. Nach WALLENFELS, KUHN u. Mitarb.[44] liegen auf Dünnschicht-Kieselgel-Chromatogrammen die β-Glykoside höher als ihre Anomeren. Da die Sophorose als α-Methylglykosid eingesetzt wurde, erhielten wir in diesem Falle nur das α-Methylheptamethylsophorosid. Wir nahmen keine Analyse der α- und β-Verbindungen vor und ordneten die β-Konfiguration in Analogie zu WALLENFELS, KUHN u. Mitarb.[44] den Glykosiden zu, die im Kieselgel-Dünnschichtchromatogramm einen höheren R_f-Wert und im Gaschromatogramm eine kürzere Retentionszeit besaßen.

b) Permethylierung von Modellglykosiden

Wie die umfangreiche Literatur beweist, bereitet die vollständige Methylierung von Glykosiden bei Substanzmengen unter 100 mg häufig Schwierigkeiten. Eine einzige Methode im Halbmikromaßstab stammt von HAKOMORI u. Mitarb.[50] zur Methylierung von Glykolipiden. 20 bis 100 mg Substanz wurden dabei durch Methyljodid mit Hilfe von Methylsulfinylcarbonsäure in DMSO glatt und rasch methyliert. Das von COREY[51] beschriebene Carbanion dient als Katalysator. Es bewirkt die Deprotonisierung und Alkoxydierung der Kohlehydrate und erleichtert damit die nachfolgende Methylierung.

Um eine Methode für den Halbmikromaßstab auszuarbeiten, studierten wir zunächst die Permethylierungsbedingungen an den bekannten Glykosiden Ruberythrinsäure, Rutin, Naringin, Hesperidin und Neohesperidin.

Wir versuchten zunächst 100 mg Ruberythrinsäure (Alizarinprimverosid) mit Dimethylsulfat nach KUHN zu methylieren. Nach 48-stündiger Methylierungsdauer wiederholten wir die Zugabe von Bariumoxid und Dimethylsulfat zur noch rot gefärbten Suspension. Nur allmählich verschwand die Rotfärbung, ein Zeichen für noch freie Hydroxylgruppen im Anthrachinonmolekül (BORN-

TRÄGER). Aus 100 mg Glykosid erhielten wir nach mehreren Versuchen 45 mg Permethylruberythrinsäure, die in gelben Nadeln kristallisierte und einen Schmelzpunkt von 233 - 234° ergab. Das von RICHTER[52] 1936 durch Purdiemethylierung erhaltene Methylderivat mit einem Schmelzbereich von 170 - 180° deutet auf ein unreines Produkt hin.

Noch schwieriger mußte die Permethylierung von Flavonoidrhamnoglykosiden sein. HOROWITZ[36] und auch CHRISTIANSEN[53] beschrieben zwar die erfolgreiche Strukturaufklärung von Naringin und Neohesperidin durch Permethylierung, gingen aber von 20 bzw. 8 g Glykosid aus.

Unsere ersten Versuche begannen wir mit 3 g Rutin. Wir methylierten mit Bariumoxid, Bariumhydroxid, DMF, DMSO und Dimethylsulfat. Da nach der Reaktion chromatographisch 13 Flecke nachweisbar waren, ist es vermutlich zu Spaltungen des Moleküls gekommen. Ähnliche Ergebnisse hatte HEIN[54] bei der Methylierung geringer Mengen von Rutin. Wir methylierten daraufhin nur noch in Stickstoffatmosphäre. Eine chromatographische Prüfung zeigte bessere Ergebnisse an.

Ein nach Kuhn-Methylierung entstandenes partiell methyliertes Rutin wurde anschließend nach PURDIE mit Silberoxid und Methyljodid behandelt. Mehrmalige Methylierung führte zu Produkten, die chromatographisch einen Hauptfleck und einige Nebenflecke erkennen ließen. Ein weiterer Schritt zur erfolgreichen Permethylierung war die Verwendung von wasserentziehendem Drierite. Die Zahl der Nebenflecke konnte so auf drei reduziert werden. Eine vorausgehende Methylierung des Glykosides mit Diazomethan brachte dagegen keinerlei Vorteile. Wie Untersuchungen von TSCHESCHE u. WULFF[32] und auch eigene Versuche ergaben, ist bei Einsatz von nur geringen Glykosidmengen die Reinheit der Reagentien für das Gelingen der Methylierung von ausschlaggebender Bedeutung: Bariumhydroxid (x 8 Mol H_2O) und Methyljodid stehen sehr rein zur Verfügung und haben keinen größeren Einfluß. Dagegen ist Bariumoxid nur schwer ganz rein zu erhal-

ten. Das Bariumoxid der Fa. Merck enthält größere Mengen Peroxid, die wahrscheinlich für Dehydrierungsreaktionen verantwortlich sind. Ein sulfidhaltiges, peroxidfreies Bariumoxid der Fa. Degussa eignete sich besser. Von Bedeutung für das Gelingen der Methylierung war auch die Qualität von DMF und DMSO. Durch Destillation über Diphosphorpentoxid bzw. durch azeotrope Destillation mit Benzol gereinigte Präparate erwiesen sich als vorteilhaft, doch sind sie nur wenig haltbar. Gute Ergebnisse ohne vorherige umständliche Reinigung erzielten wir mit Reagentien "für die Spektroskopie" der Fa. Fluka. Feuchtigkeitsausschluß während der Methylierung war unbedingte Voraussetzung. Die Glykoside wurden daher zuerst im Vakuum bei möglichst hohen Temperaturen getrocknet.
Wie weitere Versuche ergaben, war Methyljodid dem Dimethylsulfat überlegen.

Berücksichtigt man diese Kautelen und verwendet nur geringe Mengen Bariumhydroxid, dafür aber die 25-fache Menge an Bariumoxid, so kann man Rutin in Mengen von 50 bis 150 mg in guten Ausbeuten methylieren. Eine Nachmethylierung ergab bei Einsatz von 150 mg Rutin 120 mg chromatographisch einheitliches, halbkristallines Permethylrutin, entsprechend einer Ausbeute von etwa 70%. IR-spektroskopisch waren keine Hydroxylgruppen mehr nachweisbar.

Die Flavanonglykoside H e s p e r i d i n , N e o h e s p e r i d i n und N a r i n g i n methylierten wir auf gleiche Weise. Naringin ließ sich bei Raumtemperatur in 15 Stdn. in etwa 90% Ausbeute methylieren. Dagegen waren für Neohesperidin und Hesperidin längere Reaktionszeiten und zweimalige Methylierung nötig.

Die nach Hydrolyse entstandenen partiell methylierten Zucker waren rein und bestätigten, daß eine quantitative Methylierung der Glykoside erreicht worden war.

2. Permethylierung von acetylierten Flavonoidglykosiden im Halbmikromaßstab

Wie wir in längeren Versuchsreihen feststellten, bietet die Permethylierung von Glykosidvollacetaten gegenüber der Permethylierung der Glykoside erhebliche Vorteile. Die Acetate lassen sich in der Regel bequem und in fast quantitativer Ausbeute aus den Glykosiden darstellen. Die Acetate werden gut getrocknet und in Dimethylformamid gelöst. Ein Zusatz von DMSO ist unnötig. Ohne Anwendung von Stickstoff und Drierite lassen sich die Acetate mit Bariumoxid und Bariumhydroxid (Verhältnis 25:1) sowie Methyljodid in einem Schritt methylieren. Man schüttelt das Gemisch zweckmäßig bei Raumtemperatur über Nacht. Nach Aufarbeitung lassen sich die Permethylglykoside in ausgezeichneter Ausbeute gewinnen. So erhielten wir z.B. aus 60 mg Naringinacetat, entsprechend 38 mg Naringin, 40 mg Permethylnaringinchalkon. Dies entspricht einer Ausbeute von etwa 90%.

Damit läßt sich bei Vorliegen von nur etwa 50 mg eines neuen Flavonoidbiosides einfacherer Struktur meist schon eine völlige Strukturermittlung durchführen. Nach Ermittlung von Schmelzpunkt, UV-Spektrum, IR-Spektrum und chromatographischem Verhalten, wofür weniger als 5 mg nötig sind, wird die optische Drehung des Glykosides zweckmäßig in Pyridin gemessen. Diese Lösung wird anschließend sofort mit Pyridin und Acetanhydrid acetyliert. Die zu acetylierende Menge an Glykosid soll nicht weniger als 40 mg betragen. Die optische Drehung des Acetates kann in Chloroform ermittelt werden. Anschließend wird nach Abdestillieren des Chloroforms ein Kernresonanzspektrum in Trideuterochloroform hergestellt. Damit ist in vielen Fällen bereits die Struktur eines Glykosides ermittelt. Sie kann durch Permethylierung gesichert werden. Nach oben beschriebener Methode wird dabei der vom Trideuterochloroform befreite Rückstand permethyliert. Nachfolgende Hydrolyse und Untersuchung der Spaltprodukte auf chromatographischem Weg - besonders geeignet sind die Dünnschicht- und Gaschromatographie -

ermöglicht die Bestimmung der exakten Struktur. Zur Durchführung dieser Arbeiten sind nur wenige Tage erforderlich.

3. Hydrolyse permethylierter Oligosaccharide und Oligoside

a) Hydrolyse von Octamethyldisacchariden

Die Hydrolyse von methylierten Disacchariden erfolgt meßbar langsamer als die der unsubstituierten Zucker. Kleinste Substanzmengen lassen sich vorteilhaft in Ampullen hydrolysieren. Dabei lassen sich die Ergebnisse besser reproduzieren als bei der Hydrolyse unter Rückfluß, wo stets durch Zurücktropfen des Kondenswassers unterschiedliche Konzentrationen entstehen. Die Hydrolyse sollte nicht zu lange durchgeführt werden, da dann wieder mit der Bildung von Anhydrozuckern und Resynthesen von Disacchariden zu rechnen ist.

Wir hydrolysierten die dargestellten Octamethylderivate von Maltose, Cellobiose, Sophorose und Melibiose, um partiell methylierte Monosaccharide, insbesondere, um die isomeren Trimethylglucopyranosen zu erhalten. Die Hydrolyse erfolgte in Ampullen mit 0.5 n Schwefelsäure bei 98°. Nach 10 Min. war ohne jeden Zusatz von Methanol - um die teilweise Bildung von Methylglykosiden zu verhindern - völlige Auflösung der Octamethyldisaccharide erreicht. Wie die programmierte Gaschromatographie zeigte, war bei 20-minütiger Hydrolysedauer bereits ein Großteil hydrolysiert. Nach insgesamt 30-minütiger Hydrolyse war in keinem Fall mehr Ausgangsmaterial nachweisbar. Die Neutralisation des Hydrolysates erfolgte mit Bariumhydroxid. Das gebildete Bariumsulfat wurde abzentrifugiert. Die Lösungen wurden unter Zusatz von Benzol bei schwachem Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde jeweils mit abs. Äthanol aufgenommen und filtriert.

Sollen die Tetramethylhexosen quantitativ bestimmt werden, darf beim Abdestillieren des Wassers keinerlei Vakuum verwendet werden, um Verluste dieser außerordentlich flüchtigen Substanzen zu vermeiden.

Aus den Octamethylderivaten von Maltose (4-O-α-D-Glucopyranosyl-D-glucopyranose) und Cellobiose (4-O-β-D-Glucopyranosyl-D-glucopyranose) erhielten wir 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucopyranose und 2,3,6-Tri-O-methyl-D-glucopyranose.

Aus Octamethylsophorose (dem Derivat der 2-O-β-D-Glucopyranosyl-D-glucopyranose) entstand 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucopyranose und 3,4,6-Tri-O-methyl-D-glucopyranose.

Aus Octamethylmelibiose (dem Derivat der 6-O-α-D-Galactopyranosyl-D-glucopyranose) erhielten wir 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-galactopyranose und 2,3,4-Tri-O-methyl-D-glucopyranose.

Die vierte der möglichen Trimethylglucopyranosen, die 2,4,6-Tri-O-methyl-D-glucopyranose *) läßt sich durch Methylierung von Glucose mit geringen Mengen Dimethylsulfat darstellen. Die Hydroxylgruppen in 2, 4 und in 6-Stellung werden leichter methyliert als die C_3-OH-Gruppe. HAWORTH[55] gelang es erstmals, aus der Reaktionsmischung die gut kristallisierende α-Form der 2,4,6-Trimethylglucose zu gewinnen.

b) Hydrolyse von permethylierten Flavonoidglykosiden

Zur solvolytischen Spaltung von permethylierten Flavonderivaten ist der Zusatz von Alkohol nötig. Die Hydrolysedauer dieser in verdünnter Mineralsäure unlöslichen Verbindungen ist wesentlich länger als die der Octamethyldisaccharide. Wir hydrolysierten die Permethylderivate von Rutin, Hesperidin, Neohesperidin und Naringin etwa 5 Stdn. lang nach KOCHETKOV und Mitarb.[56] mit 5% Perchlorsäure in Methanol. Hydrolyse mit 5% methanolischer Salzsäure lieferte ähnliche Ergebnisse.

---

*) Für die Überlassung einer Probe 2,4,6-Tri-O-methyl-D-glucose danken wir Herrn Professor O. Aspinall, Edinburgh (Großbritan.)

Wir verdünnten das Hydrolysat mit Wasser, filtrierten vom ausgefallenen Aglykon ab und kochten nochmals 90 Minuten bei 98°, um die gebildeten Methylglykoside zu hydrolysieren. Die Säure wurde mit Dowex 1 x 8 Ionenaustauscher neutralisiert. Nach Filtration engten wir die Lösung der Methylzucker im schwachen Vakuum unter Zusatz von Benzol und Äthanol zum wasserfreien Rückstand ein. Die Methylzucker wurden in Chloroform gelöst und anschließend chromatographisch untersucht. Wir erhielten aus permethyliertem Rutin und Hesperidin 2,3,4,-Tri-O-methyl-L-rhamnose und 2,3,4-Tri-O-methyl-D-glucose, wie bei Vorliegen von Rutinosiden (6-O-α-L-Rhamnopyranosyl-D-glucopyranosiden) zu erwarten war.

Aus Naringin und Neohesperidin, die nach HOROWITZ[36] Glykoside der Neohesperidose, einer 2-O-α-L-Rhamnopyranosyl-D-glucopyranose sind, erhielten wir entsprechend 2,3,4-Tri-O-methyl-L-rhamnose und 3,4,6-Tri-O-methyl-D-glucose.

4. Identifizierung der Methylzucker mit Hilfe der Papier-, Dünnschicht- und Gaschromatographie

Die Strukturanalyse der durch Methylierung und anschließende Hydrolyse erhaltenen Methylzucker gelingt im Mikromaßstab nur durch chromatographische oder massenspektrometrische Analyse. Steht ein Massenspektrograph nicht zur Verfügung, muß die Identifizierung der Methylzucker möglichst mit Hilfe aller zur Verfügung stehender Chromatographiearten durchgeführt werden, um Fehlschlüsse zu vermeiden. Ein Beispiel ist die von NAKABAYASHI[57] 1961 irrtümlich aufgestellte Formel der Neohesperidose, die er allein auf Grund papierchromatographischer Untersuchungen der aus permethyliertem Naringin abgespaltenen Methylzucker für eine Rhamnosido-(1 ⟶ 4)-glucose hielt.

Die P a p i e r c h r o m a t o g r a p h i e wurde von BROWN u. Mitarb.[67] erstmals zur Trennung von Methylzuckern angewendet. Seither wurde eine Vielzahl von Laufmittelsystemen für die Trennung von Methylzuckern beschrieben. Doch gelingt eine sichere Trennung der isomeren Trimethylglucosen erst seit einigen Jahren.

SRIVASTAVA u. ADAMS[58] konnten 1962 in Benzol-Äthanol-Wasser-konz.Ammoniak (200:47:14:1) die Isomeren 2,3,6-Trimethylglucose und 2,4,6-Trimethylglucose trennen. Die Trennung von 2,3,4-Trimethylrhamnose und 2,3,4,6-Tetramethylglucose gelang dagegen nicht. Durch Anwendung der Chromatographie mit umgekehrten Phasen auf mit Toluol-Dimethylsulfoxid-imprägnierten Papieren gelang WALLENFELS, KUHN u. Mitarb.[44] die Trennung der 2,3,4-Trimethylglucose-Anomeren. Als Laufmittel diente dabei mit DMSO gesättigter Diisopropyläther. Geringeren Zeitaufwand und bessere Reproduzierbarkeit brachte das von TSCHESCHE und WULFF[32] entwickelte Fließmittel Butanol-Wasser-Tetrachlorkohlenstoff (4:4:3). Im Durchlaufverfahren konnten alle vier isomeren Trimethylglucosen, jedoch nicht die Trimethylgalactosen sicher getrennt werden. Zur Trennung der isomeren Galactosederivate eignete sich das von SRIVASTAVA u. ADAMS[58] gefundene System wesentlich besser. Dagegen konnten wir die "kritischen Paare" 2,3,4-Trimethylrhamnose und 2,3,4,6-Tetramethylglucose nur mit Butanol-Wasser-Tetrachlorkohlenstoff voneinander trennen.

Die D ü n n s c h i c h t c h r o m a t o g r a p h i e wurde zur Trennung von Methylzuckern von WALLENFELS, KUHN u. Mitarb.[44], unabhängig davon auch von GEE[59] erfolgreich herangezogen.
Auf Silicagelplatten können in kürzester Zeit gleichgute und oft auch bessere Trennungen als bei der Papierchromatographie erzielt werden.

Die Trennung permethylierter Disaccharide führte GEE[59] mit dem System Methyläthylketon-Toluol (1:1) auf Silicagelplatten durch. Er konnte dabei eine annähernde Trennung der Anomeren von Methyl-hepta-O-methyl-cellobiosid, -maltosid und -melibiosid erreichen. Wir fanden, daß sich Octamethylzucker am besten in ihre Anomeren auf Kieselgel-G-Platten und im System Benzol-Aceton (1:1) trennen lassen.

Zur Trennung partiell methylierter Zucker auf Silicagelplatten stehen verschiedene wasserfreie Fließmittel mit hervorragendem Trennvermögen zur Verfügung. Wir verwendeten neben Benzol-Äthanol (8:2) besonders Benzol-Aceton (1:1) und Diisopropyläther-Methanol (5:1). Diese angegebenen Mischungsverhältnisse eignen sich besonders zur Trennung von Methylzuckern mit 1 bis 2 freien Hydroxylgruppen. Bei Methylzuckern mit drei und mehr freien Hydroxylgruppen muß der Anteil des polareren Fließmittelbestandteiles erhöht werden. Die Verwendung frisch aktivierter Platten beeinflußt das Trennergebnis nicht. Lediglich der R_f-Wert der Verbindungen wird etwas erniedrigt. Eine Tabelle auf S. 92 dieser Arbeit gibt die erzielten Trennergebnisse in den verschiedenen Fließmitteln wieder. Im allgemeinen wandert die 2,3,4-Trimethylglucose am höchsten, die 2,4,6-Trimethylglucose am niedrigsten. Die 3,4,6-Trimethylglucose kann infolge Boratkomplexbildung auf borsäureimprägnierten Platten - oder auch mit Hilfe der Papierelektrophorese - gut von ihren Isomeren getrennt werden. Außerdem zeigt sie auf Chromatogrammen nach Besprühen mit Triphenyltetrazoliumchlorid Rotfärbung.

Die präparative Chromatographie von Methylzuckergemischen wurde je nach Menge an zur Verfügung stehender Substanz auf Kieselgeldickschichtplatten[60] oder auf Kieselsäuresäulen[36] durchgeführt.

Zum Sichtbarmachen der Methylzucker auf Dickschichtplatten dient der Fluorescenzindikators Pyranin. Dieser optische Aufheller, ein 3-Hydroxy-pyren-5,8,10-trisulfonsaures

Natrium läßt die Methylzucker bei 365 mμ hellblau aufleuchten.[60]

Bei der S ä u l e n c h r o m a t o g r a p h i e lieferten wir den Nachweis der Methylzucker auf folgende Weise:
Wie trugen zusätzlich auf die Säule einen auf Dünnschichtplatte als geeignet befundenen Farbstoff auf. Sudan III z.B. wandert als Leitsubstanz knapp vor der 2,3,4,6-Tetramethylglucose und zeigt damit die ersten zu sammelnden Fraktionen an. Die weiteren Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch geprüft.

G a s c h r o m a t o g r a p h i e von M e t h y l - z u c k e r n
Seitdem 1958 MC INNES u.Mitarb.[61] über die erfolgreiche gaschromatographische Trennung von permethylierten Monosacchariden berichteten, hat die Zahl der Veröffentlichungen auf diesem Gebiet ständig zugenommen. Bisher wurden stets nicht reduzierende Zuckerderivate, wohl auf Grund ihrer größeren Stabilität gaschromatographisch untersucht. Dabei gelang KIRCHER [62] erstmals die Trennung von anomeren permethylierten Glykosiden.

Über die erste Trennung von M e t h y l - h e p t a m e - t h y l d i s a c c h a r i d e n wurde von BISHOP[63] sowie von GEE und WALKER im Jahre 1962 berichtet. Als flüssige Phase verwendeten GEE u. WALKER[64] Neopentylglykolsuccinat. Auch wir verwendeten diese Phase, um unsere dargestellten Octamethyldisaccharide auf Reinheit und später auf vollständige Hydrolyse zu überprüfen. In jedem Falle gelang dabei die Trennung in die beiden Anomeren. Dabei gilt nach BISHOP[65] für Derivate der Glucopyranose die Regel, daß die niedrigere Retentionszeit stets dem Anomeren zukommt, dessen glykosidische Methoxygruppe in t r a n s - Stellung zur C_2-Methoxygruppe steht. Das bedeutet, daß jeweils das β-Anomere als erster Peak erscheint.

Einen großen Fortschritt bedeutet die Trennmöglichkeit für p a r t i e l l m e t h y l i e r t e M e t h y l g l y k o s i d e . Die ersten Erfolge erzielten hier 1960 BISHOP u. COOPER[66]. Auch die Methylglykoside von Dimethylhexosen und sogar einfache Methylglykoside[68] sind für die Gaschromatographie noch genügend flüchtig. Darüberhinaus eignet sich die Gaschromatographie hervorragend zur Identifizierung nichtreduzierender Derivate, wie sie z.B. bei der Methylierung oder Hydrolyse von Zuckern entstehen. KIRCHER[62] fand beispielsweise, daß nach Hydrolyse von permethyliertem Dextran oder von Methyl-2,3,4-Tri-O-methyl-β-D-glucopyranosid, und anschließender erneuter Glykosidierung neben den zu erwartenden anomeren Glykosiden auch 2,3,4-Tri-O-methyl-1-6-anhydroglucopyranose als Artefakt endstanden war. Dieses auf Papierchromatogrammen nicht entdeckte Produkt hatte eine wesentlich kürzere Retentionszeit als die Methylglykoside.

Es gelingt ferner, gaschromatographisch Furanoside, Pyranoside und offenkettige Aldehydzuckerderivate zu trennen. BAYER u. WIDDER[69] untersuchten die bei direkter Kuhn-Methylierung von Glucose entstandenen Derivate. Sie fanden, daß die erwarteten Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucopyranoside nur zu 76% entstehen. Als weitere Produkte fanden sie u.a. 2,3,4-Tri-O-methyl-1-6-anhydro-glucopyranose (2,3,4-Trimethyllaevoglucosan) und zu 0.3% 2,3,4,5,6-Pentamethylglucose, das Derivat der offenkettigen freien Aldehydform der Glucose. Damit wurde ein Zuckerderivat mit freier reduzierender Aldehydgruppierung auch gaschromatographisch nachgewiesen.

Wie diese Beispiele zeigen, sind die Möglichkeiten der Gaschromatographie auf dem Gebiet der Methyläther von Zuckern weitreichend. Voraussetzung für die erfolgreiche Anwendung der Gaschromatographie sind die Flüchtigkeit der zu untersuchenden Substanz unterhalb 250°, ihre Stabilität bei der Betriebstemperatur sowie eine stabile inerte Phase mit grosser Oberfläche und eine leistungsfähige, bei Betriebstemperatur noch nicht flüchtige flüssige Phase.

Allgemein gelten für Kohlehydratderivate folgende Regeln[65]:
Je niedriger die Temperatur der Säule, um so besser die Trennung.

Je mehr freie Hydroxylgruppen im Molekül, umso schwerer flüchtig ist die Substanz und umso höher muß daher die Betriebstemperatur gewählt werden.

Je mehr freie Hydroxylgruppen im Molekül, umso geringer soll Polarität und Konzentration der flüssigen Phase sein, um optimale Trennungen zu erzielen. Die Dünnfilmtechnik kommt bereits mit 1 bis 5%ig imprägnierten Säulen aus.

Je polarer die flüssige Phase, umso besser ist die Trennung für vollsubstituierte Zucker.

Allgemein gültige Beziehungen zwischen Struktur und relativer Retentionszeit können auf dem Gebiet der partiell methylierten Zucker nicht aufgestellt werden, da auf veränderten Phasen manchmal eine unterschiedliche Reihenfolge der getrennten Zucker zu beobachten ist. Wird eine Substanz über zwei gleichartige Trennsäulen bei gleichen Betriebsbedingungen chromatographiert, so ergeben sich für die Retentionszeiten Schwankungen von 1 bis 5%. Vielfach werden daher relative Retentionszeiten, bezogen auf eine Standard-Substanz, etwa β-Methyl-2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucopyranosid angegeben. In der Regel sind jedoch zur sicheren Identifizierung der Methylzucker Testsubstanzen zu verwenden.

Gaschromatographische Trennung von reduzierenden Methylzuckern

Erstmals gelang uns die Trennung von partiell methylierten Zuckern mit freier Hydroxylgruppe am anomeren C-Atom. Stets wurden bisher Methylzucker mit einer unsubstituierten Hydroxylgruppe am anomeren C-Atom nach Überführung in die Methylglykoside (mit Hilfe von methanolischer HCl) gaschromatographisch untersucht. Dabei wurden die anomeren Glykoside in der Regel in zwei Peaks aufgetrennt. KIRCHER[62] stellte 1960 fest, daß

die Tetra-O-methylglucose nicht durch die verwendete Säule wanderte. Ihr Methylglykosid trennte sich jedoch in zwei Peaks, die den beiden Anomeren entsprechen. KIRCHER arbeitete mit 43%ig imprägnierten Säulen von Permthyl-O-(2-hydroxyäthyl)-cellulose auf Chromosorb. Wir versuchten daher, die freien Methylzucker auf schwach imprägnierten Säulen zu trennen. Da bereits die Methylglykoside von Di- und Mono-methylhexosen gaschromatographisch getrennt wurden, sollte es auch möglich sein, Trimethylhexosen mit zwei freien Hydroxylgruppen bei ähnlichen Betriebsbedingungen zu chromatographieren. Erste Versuche mit APIEZON M in 3% Konzentration auf Chromosorb WS zeigten, daß bei nur 150° die Zucker auf 2m Säulen chromatographiert werden konnten. Die Testsubstanzen ergaben nur einen Peak, hatten sich daher vermutlich nicht zersetzt. Die Auftrennung der beiden Anomeren war nicht erfolgt.

Um bessere Trennungen zu erzielen, verwendeten wir eine Säule mit dem etwas polareren Fluoroalkylsilikon QF 1 auf Gaschrom Q. Die Säulentemperatur senkten wir auf 140°. Die erhaltenen Peaks zeigten Schwanzbildung.

Wir erprobten daraufhin den noch polareren Polyester Neopentylglykol-succinat auf Gaschrom Q in 10% Konzentration. Diese für Methylglykoside partiell methylierter Zucker schon von GEE und WALKER[64] benutzte Säule trennte die Methylzucker wesentlich besser als die oben beschriebenen Säulen. Die Retentionszeiten für die in nachfolgender Tabelle aufgeführten Methylzucker waren infolge des polaren Charakters der Säule sehr lang. Die 2,3,4-Trimethylglucose konnte nicht sicher identifiziert werden. Wir erhielten drei Peaks von unterschiedlicher Höhe. Ein Peak hatte eine für die 2,3,4-Trimethylglucose erwartete Retentionszeit. Die beiden anderen Peaks wiesen wesentlich kürzere Retentionszeiten auf. Bei höherer Säulentemperatur erhielten wir neben einem schwachen Peak, der vermutlich von unzersetzter Trimethylglucose herrührte, einen Hauptpeak, der eine kürzere Retentionszeit hatte. Wir halten eine Zersetzung in die schon von KIRCHER[62] beobachtete 2,3,4-Trime-

thyl-1,6-anhydroglucopyranose (2,3,4-Trimethyl-laevoglucosan) für wahrscheinlich. Solche Anhydrozucker entstehen durch intramolekulare Wasserabspaltung. Authentische Testsubstanz war nicht vorhanden.

T a b e l l e 1

Retentionszeiten von Methylzuckern

Substanz	Angabe in Minuten					
	Säule A 150°	Säule A 175°	Säule B 140°	Säule C 158°	Säule C 168°	Säule C 178°
2,3,4-Trimethyl-rhamnose	6.6	3.6	7.5_s	10.2	8.2	
2,3,5-Trimethyl-arabinose				8.4		
2,3,4,6-Tetramethylglucose	8.4	4.4	7.8_s		12.7	
2,3,6-Trimethyl-glucose	9.8	5.4	15.0_s		28.4	23.3
2,4,6-Trimethyl-glucose	11.7	5.9	16.7_s		44.1	
3,4,6-Trimethyl-glucose					33.3	
2,3,4-Trimethyl-glucose					z(30.4)	26.5 10.9

Säule A: 3% Apiezon M auf Chromosorb WS; 50 ml Argon/Min.
Säule B: 10% QF 1 auf Gaschrom Q; 65 ml Argon/Min.
Säule C: 10% Neopentylglykolsuccinat auf Gaschrom Q; 80 ml Argon/Min.

Erläuterungen: s = Schwanzbildung
z = Zersetzung in mehrere Peaks

Wir verwendeten stets 2 m lange Säulen.

Die beste Trennung aller isomeren Trimethylglucopyranosen erhielten wir mit dem in seiner Polarität zwischen QF 1 und Neopentylglykol-succinat stehenden Polyphenyläther in 15% Konzentration auf Gaschrom Q bei 170°. Polyphenyläther, ein m-Bis-(m-phenoxyphenoxy)-benzol wurde von ASPINALL[70] erfolgreich für die Trennung einer Vielzahl von Methylglykosiden verwendet. Da alle uns zur Verfügung stehenden Substanzen auf einer 2 m Säule von Polyphenyläther getrennt wurden, wählten wir diese Säule für die Identifizierung von Methylzuckern aus Flavonoidglykosiden. Alle Methylzucker, ausgenommen die 2,3,4-Trimethylglucose, ergaben nur einen Peak. Die Chromatographie der 2,3,4-Trimethylglucose ergab stets zwei Peaks. Von diesen sprach der eine mit kurzer Retentionszeit für das Vorliegen von 2,3,4-Trimethyllaevoglucosan.

Die Gaschromatographie von Methylzuckern mit reduzierender Hydroxylgruppe zeigt, daß die Darstellung von Methylglykosiden nicht unbedingt nötig ist, um gaschromatographische Trennungen durchzuführen. Ob die Methylzucker mit freiem Hydroxyl am C_1 die Säulen tatsächlich zum größten Teil unzersetzt passieren, kann mit Sicherheit nur auf dem Wege der präparativen Gaschromatographie ermittelt werden. Einige Anzeichen sprechen dafür, daß auch die reduzierenden Methylzucker unter den gewählten Bedingungen stabil sind.

Sowohl Oxidation als auch Hydrolyse sind unwahrscheinlich, da stets bei inertem Argon-Gasdurchfluß gearbeitet wurde.

Die Retentionszeiten sind länger als die der entsprechenden Methylglykoside, wie Vergleiche mit Literaturwerten - bei gleichen Betriebsbedingungen - zeigen. Die Methylzucker wurden in der Regel jeweils in nur einen Peak mit charakteristischer, reproduzierbarer Retentionszeit getrennt.

Mit Wasseraustritt aus dem Molekül einer Trimethylglucose muß bei steigender Temperatur in wachsendem Maße gerechnet werden. Im Falle der 2,3,4-Trimethylglucose ist die Bildung des 1,6-

Anhydroderivates bei den gewählten Temperaturen wahrscheinlich. Da der Einlaß 30 bis 40° höher beheizt ist als die Säule, tritt die angenommene Wasserabspaltung sicherlich unmittelbar nach dem Einspritzen, nicht erst allmählich in der Säule ein. Im letzteren Falle müßte eine Vielzahl von Peaks entstehen.

Ein Vorteil der Untersuchung der reduzierenden Methylzucker gegenüber der daraus hergestellten Methylglykoside besteht darin, daß keine Trennung in die Peaks der beiden Anomeren auftritt. Damit werden bei der Strukturanalyse von Oligo- und Polysacchariden die im Gaschromatogramm erhaltenen Peaks auf die Hälfte reduziert. Auch eine Glykosidierung von Hydrolyseprodukten mit methanolischer Salzsäure zu den entsprechenden Methylglykosiden entfällt. Das Hydrolysat kann nach Neutralisation und Abdestillieren des Wassers direkt zur gaschromatographischen Untersuchung verwendet werden. Dazu wird der Rückstand in Methanol oder Chloroform gelöst.

Die Gaschromatographie der reduzierenden Methylzucker zeichnet sich durch hohe Trennleistung aus und stellt eine weitere Möglichkeit zur raschen Identifizierung von Methylzuckern dar.

III. ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLÄRUNG EINES ISOSAKURANETIN-RHAMNOGLUCOSIDES (DIDYMIN) AUS MONARDA DIDYMA L.

Erstmals isolierten HATTORI und Mitarb.[71] 1944 aus Poncirus trifoliata RAF. ein Isosakuranetin-7-rhamnoglucosid. Es wurde Poncirin genannt und zeichnete sich durch bitteren Geschmack aus. Das Aglykon Isosakuranetin war 1929 von HATTORI[72] isoliert und 1928 von SHINODA u. SATO[73] synthetisiert worden. In den letzten 20 Jahren wurden wiederholt Isosakuranetinrhamnoglucoside aufgefunden und, wohl auf Grund des gleichen Schmelzpunktes, für Poncirin gehalten. 1961 und 1963 berichtete HOROWITZ[36)74] und unabhängig davon im Jahre 1961 auch NAKABAJASHI[57], daß Poncirin das Neohesperidosid des Isosakuranetins sei. DUNLAP u. WENDER[75] entdeckten 1960 in Citrus paradisi MACF. ein Isosakuranetinrhamnoglucosid, das sie zunächst für Poncirin hielten. Zwei Jahre später fanden sie aber, daß das Glykosid schon auf Grund des fehlenden bitteren Geschmacks nicht mit Poncirin identisch sein könne. Im Jahre 1965 berichteten dann unabhängig voneinander MIZELLE u. Mitarb.[77] sowie GENTILI u. HOROWITZ[20], daß neben dem Isosakuranetin-7-neohesperidosid Poncirin auch ein geschmackloses Isosakuranetin-rutinosid in süßen Citrusfrüchten vorkommt. Da die Autoren nur sehr geringe Mengen dieses Glykosides isolieren konnten, wurden keine genauen Eigenschaften des Rutinosides angegeben.

Im Jahre 1965 isolierten BRIESKORN u. MEISTER[78] ein weiteres Isosakuranetinbiosid aus den Blättern der Labiatenpflanze Monarda didyma L.. Nach Hydrolyse wurden Isosakuranetin, Rhamnose und Glucose erhalten. Auf Grund der Ergebnisse einer partiellen Hydrolyse vermuteten die Autoren, daß die Rhamnose mit dem Aglykon verknüpft und die Glucose endständig an die Rhamnose gebunden sei. Die Verknüpfungsweise war ungewöhnlich, denn alle bis dahin aufgefundenen Rhamnoglucoside der Flavonoidreihe enthielten die Rhamnose als endständigen Zucker.

Wegen Substanzmangels führten BRIESKORN u. MEISTER keine weiteren Untersuchungen durch. Um die noch fehlende Beweisführung für dieses neue Disaccharid zu liefern, isolierten wir dieses Glykosid ein zweites Mal. Mit Hilfe der an Modellglykosiden erarbeiteten Halbmikromethode zur Strukturanalyse von Disacchariden versuchten wir anschließend, die Struktur des Biosides zu ermitteln.

Isolierung*):
Die von BRIESKORN u. MEISTER[78] angegebene Methode zur Isolierung des Glykosides ließ sich nicht reproduzieren. Wir entfernten das Chlorophyll und andere lipophile Stoffe mittels Chloroformextraktion. Zur Isolierung des Glykosides wurde die Blattdroge anschließend mit Methanol im Soxhlet extrahiert. Die Lösung wurde konzentriert und von ausgefallenen Verunreinigungen, die chromatographisch kein Flavonoid enthielten, abfiltriert. Mit Aceton ließen sich hydrophile Begleitstoffe, vornehmlich Zucker, ausfällen. Das Glykosid ließ sich schließlich aus wässriger Lösung mit Äthylacetat ausschütteln und aus Äthanol kristallisieren. Da die Mutterlaugen chromatographisch noch viel Isosakuranetinglykosid enthielten, wurden sie auf Polyamid mit Wasser chromatographiert. Aus verdünntem Alkohol erhielten wir weitere Mengen des weißen, in feinen Nadeln kristallisierenden Glykosides vom Schmelzbereich 209 - 212°. Insgesamt erhielten wir 670 mg Glykosid, entsprechend einer Ausbeute von 0.037%. BRIESKORN u. MEISTER[78] konnten - ohne Zuhilfenahme der Chromatographie - nur 0.018% isolieren.

Strukturaufklärung:
Das isolierte Glykosid ist zum Unterschied von Poncirin geschmacklos. Im Schmelzpunkt ist es praktisch identisch mit dem Glykosid von BRIESKORN u. MEISTER[78] (209 - 212°). Nach den Messungen der Autoren ist das Biosid optisch inaktiv ($[\alpha]_D = 0^\circ$). Wir fanden dagegen einen Drehwert von $[\alpha]_D = -105.3^\circ$ (Methanol). Die Autoren beschrieben ein Glykosidacetat

*) Für die Übersendung und Bestimmung des Pflanzenmaterials danken wir Herrn Professor Dr. O. Volk, Würzburg.

vom Schmelzpunkt 105 - 106°, dessen Acetatanalyse auf nur partiell erfolgte Acetylierung schließen ließ. Unser Glykosid ergab nach Acetylierung ein kristallines Heptaacetat vom Schmp. 116 - 119°. Trotz dieser Unterschiede besteht zwischen beiden Glykosiden Identität, wie eine IR-Überlagerung zeigt.

Die H y d r o l y s e des Glykosides mit 1.5 n Salzsäure lieferte schon beim Erkalten der Lösung lange, weiße Nadeln eines Aglykons vom Schmp. 190 - 192°. Im Mischschmelzpunkt mit synthetischem Isosakuranetin entstand keine Depression. Als Zucker wurden chromatographisch und durch Darstellung der Osazone eindeutig Glucose und Rhamnose nachgewiesen.

Da das Glykosid eine positive Eisen-III-chlorid-reaktion gab, mußte das C_5-Hydroxyl des Aglykons frei sein. Das bedeutet, daß die beiden Zucker als Biose an das C_7-Hydroxyl des Aglykons gebunden sein mußten.

Wir versuchten daher die p a r t i e l l e H y d r o l y s e nach FOX u. Mitarb.[79], bei der an Flavonoidbiosiden bevorzugt der endständige Zucker abgespalten wird. Nach etwa neunstündiger Hydrolyse in der Siedehitze wurde die Lösung chromatographisch untersucht. Neben unverändertem Glykosid und nur wenig Aglykon war als Hauptmenge ein Monoglykosid nachweisbar. Die Identifizierung des abgespaltenen Endzuckers mußte die Frage klären, ob tatsächlich die Glucose endständig an die Rhamnose gebunden sei.

Unser Ergebnis stand im Widerspruch zu dem durch enzymatische Hydrolyse abgeleiteten Ergebnis von BRIESKORN u. MEISTER[78]. In verschiedenen Laufmitteln zeigten Dünnschichtchromatogramme ebenso wie Papierchromatogramme mit Anilinhydrogenphthalatreagens einen kräftigen, graugrün gefärbten Rhamnosefleck. Nur sehr viel schwächer und kaum erkennbar war der bräunliche Glucosefleck. Unser Ergebnis sprach also dafür, daß - wie bei allen bisher gefundenen vergleichbaren Glykosiden - die Glucose an das Isosakuranetin gebunden war und die Rhamnose den endständigen Zucker darstellte.

Bei Richtigkeit dieses Befundes mußte es daher möglich sein, durch Isolierung des entstandenen Monoglucosides zu dem bereits bekannten Isosakuranetin-7-β-monoglucosid, Isosakuranin genannt, zu gelangen.

Zur I s o l i e r u n g des bei der partiellen Hydrolyse nach FOX u. Mitarb.[79] entstandenen M o n o g l u c o s i d e s wurde die präparative Papierchromatographie mit 2% Essigsäure als Laufmittel eingesetzt. Unter dem UV-Licht wurden die als dunkelgraue Bänder erkennbaren Monoglykosidzonen herausgeschnitten und mit 70% Methanol über Nacht eluiert. Die chromatographisch reine Lösung wurde eingeengt. Aus verdünntem Aceton erhielten wir weiße Kristalle, die nach mehrmaligem Umkristallisieren den gleichen Schmelzpunkt aufwiesen, wie das kürzlich von PACHECO[80] erstmals synthetisch dargestellte Isosakuranin (Schmp. 184 - 186°). Das erhaltene Glykosid war auch in jeder Beziehung identisch mit dem von uns synthetisierten Isosakuranin (III). Damit war bewiesen, daß im genuinen Glykosid Rhamnose tatsächlich als endständiger Zucker vorlag und daß die Biose über das C_7-Hydroxyl an das Aglykon gebunden sein mußte.

Um zu klären, ob die Rhamnoglucose als 6-O-α-L-Rhamnopyranosyl-D-glucopyranose (Rutinose), 2-O-α-L-Rhamnopyranosyl-D-glucopyranose (Neohesperidose) oder als ein 1 ⟶ 3 oder 1 ⟶ 4 verknüpftes Disaccharid vorlag, versuchten wir, das i n t a k t e D i s a c c h a r i d zu erhalten.

Aus Rutin läßt sich die am C_3-Hydroxyl befindliche Rutinose mit 10% Essigsäure in guter Ausbeute darstellen. CHANDLER und HARPER[33] führten Versuche an Rutin und den beiden Flavanonglykosiden Naringin und Hesperidin durch. Sie fanden, daß ein an das C_7-Hydroxyl gebundenes Disaccharid im Gegensatz zu C_3-O-Diglykosiden durch Säureabbau praktisch nicht intakt abgespalten werden kann. Wir dehnten unsere Untersuchungen auf die Flavanonrhamnoglucoside Neohesperidin und Isosakuranetin-rhamno-glucosid aus. Nach BAILEY[16] ist ein 1⟶ 6 verknüpftes Disaccharid gegenüber Säure viermal stabiler als ein 1 ⟶ 4 verknüpftes

und dieses wiederum stabiler als ein 1 ⟶ 2 verknüpftes Disaccharid. Die Chance, ein Disaccharid intakt abzuspalten, muß daher im Falle der Rutinose größer als bei der Neohesperidose sein. Wir variierten die Essigsäurekonzentration, die Temperatur und die Hydrolysedauer.

Die Untersuchungen ergaben, daß die Neohesperidoside Naringin und Neohesperidin bevorzugt an der Rhamnose - Glucose - Bindung hydrolysiert wurden. Primär entstand also jeweils das Monoglucosid. Es gelang in keinem Falle, Neohesperidose chromatographisch nachzuweisen. Im Gegensatz dazu erhielten wir nach 10-stündiger Hydrolyse mit 10% Essigsäure aus dem Isosakuranetin-7-rhamnoglucosid etwa gleiche Mengen Rhamnose und gewünschtes Disaccharid. Die Hydrolyse hatte also hier nicht bevorzugt an der Rhamnose - Glucose - Verknüpfung stattgefunden.

Die abgespaltene Biose hatte in verschiedenen Fließmitteln auf Papier- und Dünnschichtchromatogrammen jeweils gleichen R_f-Wert wie aus Rutin gewonnene R u t i n o s e . Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen von BAILEY[16] und TIMELL[26], daß die 1 ⟶ 6 Bindung in verküpften Aldohexopyranosen wesentlich stabiler ist als die 1 ⟶ 2 Bindung.

Zur Sicherung der Rutinosestruktur führten wir mit dem Flavanonrhamnoglucosid eine P e r m e t h y l i e r u n g durch. Im Gegensatz zu Naringin erhielten wir nach 14-stündiger Reaktionsdauer noch kein einheitliches Produkt. Erst nach insgesamt 41-stündiger Methylierungsdauer, also nach dreimal längerer Reaktionszeit als bei der Naringinmethylierung, erhielten wir chromatographisch reines Heptamethylderivat. Diese Beobachtung bestätigt unsere Feststellung, daß in der Reihe der Derivate von 5,7-Dihydroxy-flavanon-7-glykosiden eine in 4'-Stellung befindliche Methoxygruppe die Glykosidpermethylierung im Vergleich zu dem 4'-Hydroxyderivat Naringin wesentlich erschwert.

Nach Methanolyse der Permethylverbindung mittels 5% methanolischer Salzsäure und anschließender Hydrolyse erhielten wir 2 , 3 , 4 - T r i - O - m e t h y l - L - r h a m n o s e und

2 , 3 , 4 - T r i - O - m e t h y l - D - g l u c o s e .
Dies wurde durch Dünnschicht- und Gaschromatographie bewiesen.

Die gefundene 2,3,4-Tri-O-methyl-L-rhamnose bestätigt die terminale Anordnung der Rhamnose, die gefundene 2,3,4-Tri-O-methyl-D-glucose beweist die Bindung der Rhamnose an das C_6-Hydroxyl der Glucose. Damit stellt das Flavanonglykosid aus Monarda didyma L., für das wir den Namen D i d y m i n vorschlagen, ein 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7-(6-O-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid) dar. Ungeklärt war nun lediglich die sterische Konfiguration der Zucker.

Bestimmung der optischen Konfiguration des Didymins:

In Weiterentwicklung des van't Hoff'schen "Prinzips der optischen Superposition" und der daraus entstandenen präziseren HUDSON'schen Regel[81] sagt die von KLYNE[38] auf Grund von Untersuchungen an Steroidglykosiden aufgestellte Regel aus: Die molekulare Drehung eines Glykosides, dem ein optisch aktives Aglykon zu Grunde liegt, entspricht der Summe der molekularen Drehungen des Aglykons und des entsprechenden α- oder β-Methylglykosides. Die Klyne'sche Regel ist nach HOROWITZ u. GENTILI[36] auch zur Bestimmung der Konfiguration des endständigen Zuckers in Rhamnoglucosiden von Flavonoiden anwendbar. Als optisch aktives Aglykon wird dabei das Glucosid aufgefaßt. Die beiden Autoren errechneten, daß die Rhamnose in Neohesperidosiden (Poncirin, Naringin) alpha-verknüpft ist. Daß auch in Rutinosiden die Rhamnose mit der Glucose alpha- und nicht, wie ZEMPLEN[82] vermutete, beta-verknüpft ist, bewiesen GORIN und PERLIN[83].

Ein Vergleich der optischen Drehungen von Didymin, Isosakuranin (Isosakuranetin-7-glucosid) und α- bzw. β-Methylrhamnosid bestätigt die α-Verknüpfung der Rhamnose im Rutinosid:

T a b e l l e 2

Optische Drehung von Derivaten der Rhamnose

Substanz	Lösungsmittel	$[\alpha]_D$	M_D
Methyl-α-L-rhamnosid*)	Wasser	-62.5^o	-11.1
Methyl-β-L-rhamnosid*)	Wasser	$+95.4^o$	+17.0
Isosakuranin**)	Pyridin	-55.3^o	-25.8
Didymin	DMSO	-72.5^o	-44.4

*) Daten zitiert bei R.HOROWITZ u. B.GENTILI, Tetrahedron 19, 773 (1963)

**) Daten zitiert bei H.PACHECO u. A.GROUILLER, Bull.Soc.Chim. France 2937 (1965)

Der nach KLYNE[38] berechnete Wert ist für das α-Rhamnosylglucosid -(11.1 + 25.8) = -36.9. Er kommt dem für Didymin berechneten Wert von -44.4 sehr viel näher als der Wert des β-Rhamnosylglucosides. Letzterer beträgt -8.8 und berechnet sich aus der molekularen Drehung von Isosakuranin plus der molekularen Drehung von β-Methylrhamnosid (-25.8 + 17.0 = -8.8).

Die zweite zu klärende Frage war die Art der Verknüpfung der Rutinose mit Isosakuranetin.

Es ist bekannt, daß im Isosakuranetin-7-glucosid die Glucose beta-verknüpft ist, da Isosakuranin von β-Glucosidase hydrolysiert wird[84]. Durch Überführung des Didymins in Isosakuranin war damit auch die β-Konfiguration der Rutinose am Isosakuranetin klargestellt.

Einen zusätzlichen Beweis erhielten wir durch ein Kernresonanzspektrum des H e p t a t r i m e t h y l s i l y l ä t h e r s von Didymin (Ia). Ein breites Signal bei δ = 4.9 ppm (J = 7 cps) ist nach RÖSLER u. Mitarb.[85] beweisend für ein axial-axial gekoppeltes Proton am C_1 der Glucose in Flavonoid-7-rhamnoglucosiden. Damit ist die Rutinose aequatorial, also β-ver-

knüpft. Dem aus Monarda didyma L. isolierten Didymin kommt damit die Struktur eines 5,7-Dihydroxy-4'methoxy-flavanon-7-β-[6-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosides] (I) zu.
IR-Spektrum von natürlichem Didymin (Abb. 9) auf Seite 51.

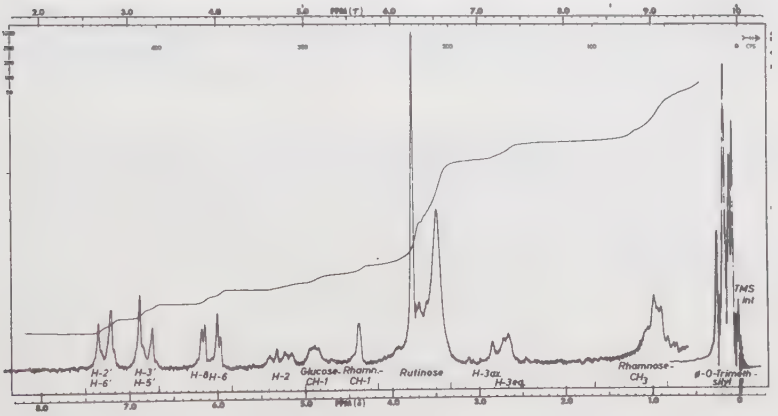


Abb. 1
KMR-Spektrum des Didymin-heptatrimethylsilyläthers (Ia)

Schließlich sei hier noch der Vollständigkeit wegen angeführt, daß nach RÖSLER u. MABRY[85)135)] auch die KMR-Spektroskopie der Glykosidacetate eine gute Methode darstellt, um zwischen Rutinosiden und Neohesperidosiden zu unterscheiden. In beiden Rhamnoglucosiden erscheinen die Protonen der Rhamnose-methylgruppe bei δ = 1,0 bis 1,3 ppm. Alle Protonen, die C-Atomen mit acetyliertem Hydroxyl zugehörig sind und die Protonen am C_1 der beiden Zucker werden bei niedrigem Feld, die Protonen, die neben einer Sauerstoffbrücke liegen, dagegen bei höherem Feldbereich gefunden. Für Rutinoside ergeben sich dabei Multiplette mit einem Integrationsverhältnis von 8 (7+1) zu 4 Protonen. Dabei ist das C_1-Proton der Rhamnose auf Grund seiner Schärfe besonders auffallend. Neohesperidoside ergeben dagegen ein Protonenverhältnis von 7 zu 4.

Im Spektrum des D i d y m i n h e p t a a c e t a t e s (Ib) erscheinen im Bereich von δ = 3.6 bis 4.0 ppm Signale, die zu vier Protonen integrieren (Multiplett), im Bereich von δ = 5.1 bis 5.4 ppm und bei δ = 4.7 ppm Signale, die insgesamt 8 (7+1) Protonen entsprechen.

Die Methoxysignale im Isosakuranetin liegen zwar auch im Bereich von δ = 3.6 bis 4.0 ppm, doch sind sie in Form eines scharfen Signals gut charakterisiert.

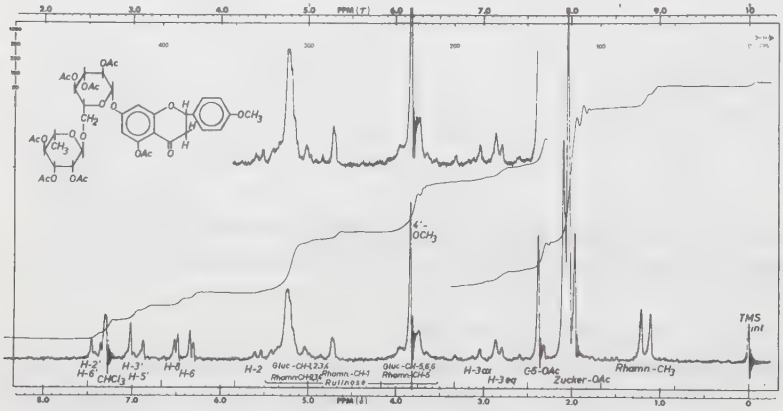


Abb. 2: KMR-Spektrum von Didyminheptaacetat (Ib)

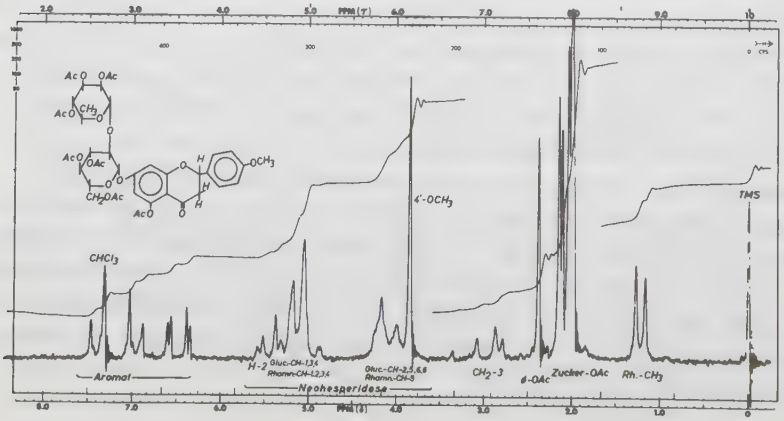


Abb. 3: KMR-Spektrum von Poncirinheptaacetat (IVa)

Überblick über die Synthesen von Rutinosiden und Neohesperidosiden der Flavanon- und Flavonreihe

Die noch bis vor kurzem fehlenden modernen Methoden der Strukturermittlung von Biosiden haben in der Literatur zur Beschreibung einer Vielzahl von Flavanon- und Flavonrhamnoglucosiden geführt, deren Strukturen bis auf wenige Fälle noch nicht exakt geklärt sind.

Um auch die dadurch zugleich entstandenen Namensverwirrungen und Irrtümer zu beseitigen, haben wir versucht, die wichtigsten Flavonoid-7-O-rhamnoglucoside synthetisch darzustellen.

Eine Tabelle über die synthetisierten Glykoside findet sich auf Seite 79.

IV. SYNTHESE DES ISOSAKURANETIN-RUTINOSIDES DIDYMIN

1. Synthese des Isosakuranetins

Erstmals synthetisierten SHINODA u. SATO[73] 1928 das Isosakuranetin. Die Autoren fanden, daß die Methode von KOSTANECKI - Kondensation von Methoxyacetophenon mit Methoxybenzaldehyd - zur Darstellung von Polyoxychalkonen ungeeignet ist. Wesentlich besser eignet sich die BEHN' sche Methode. Danach werden Polyoxyphenole mit Zimtsäurechlorid in Nitrobenzol mittels Aluminiumchlorid zu Chalkonen kondensiert. Bei Anwendung von Phloroglucin entstehen dabei hauptsächlich Flavanonderivate und nur sehr geringe Mengen Chalkonderivate.

Wir kondensierten daher in Anlehnung an SHINODA und SATO[73] Phloroglucin mit p-Methoxyzimtsäurechlorid in Nitrobenzol in Gegenwart von Aluminiumchlorid. Da nach einem dünnschichtchromatographischen Bild eine säulenchromatographische Trennung angezeigt erschien und wir nach SHINODA's Methode nur eine geringe Ausbeute erhielten, trennten wir das nach Erhitzen des Komplexes entstandene Isosakuranetin auf Kieselgelsäulen mit Benzol-Äthylacetat von den Verunreinigungen ab. Wir konnten kristallines Isosakuranetin (II) vom Schmp. 190 - 193° in 31%iger Ausbeute gewinnen. BRIESKORN[78] gibt eine Ausbeute von 10% an. Bei SHINODA[73] finden sich keine Mengenangaben.

Acetylierung ergab kristallines Isosakuranetin-5,7-diacetat (IIa) vom Schmp. 120 - 121°.

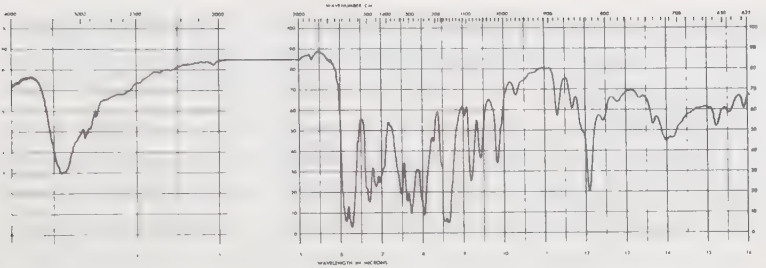


Abb. 4

IR-Spektrum von synthetischem Isosakuranetin (II)

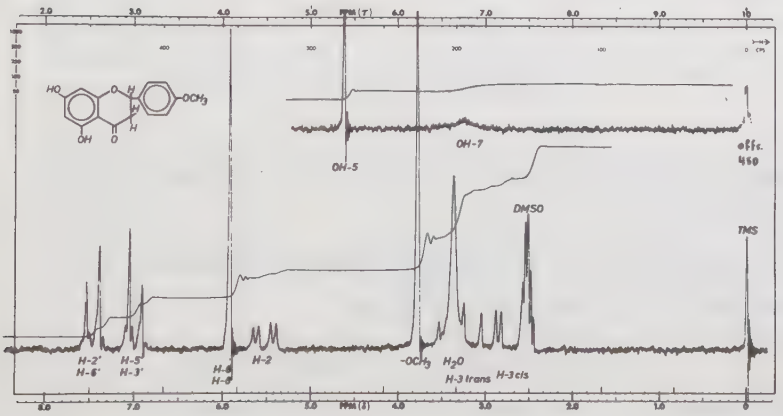


Abb. 5

KMR-Spektrum von synthetischem Isosakuranetin (II)

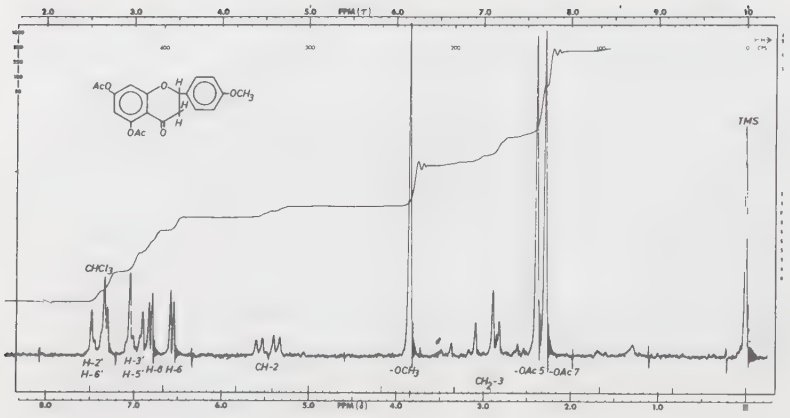


Abb. 6

KMR-Spektrum von Isosakuranetin-5,7-diacetat (IIa)

Synthese von Glykosiden des 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanons (Isosakuranetin):

Isosakuranetin + α-Acetobromglucose ⟶ Isosakuranin

Isosakuranetin + α-Acetobromcellobiose

⟶ Isosakuranetin-7-cellobiosid

Isosakuranetin + α-Acetobromrutinose ⟶ Didymin

Isosakuranetin + α-Acetobromneohesperidose ⟶ Poncirin

2. Synthese von 5,7-Dihydroxy-4'methoxy-flavanon-7-mono-β-D-glucosid (Isosakuranin) (III)

Isosakuranin wurde erstmals von PACHECO und GROUILLER[80] im Jahre 1965 synthetisiert. Dabei wurden Phloroacetophenon und α-Acetobromglucose kondensiert und das erhaltene Diglucosid in drei Stufen in Isosakuranin übergeführt. Genaue Ausbeuten der einzelnen Zwischenstufen wurden nicht mitgeteilt.

Um Vergleichssubstanz für das durch partielle Hydrolyse des Didymins gewonnene Monoglucosid zu erhalten, synthetisierten wir das Isosakuranin aus Isosakuranetin und α-Acetobromglucose in Chinolin mit Silbercarbonat[86]. Wir konnten das Glykosid in nahezu 50%iger Ausbeute kristallin gewinnen. Chromatographische Reinigung war dabei nicht nötig. Das synthetische Isosakuranin (III) war in jeder Beziehung identisch mit dem von uns aus Didymin gewonnenen Isosakuranin.

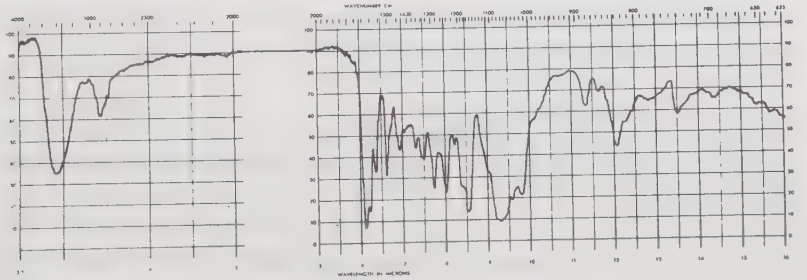


Abb. 7 : IR-Spektrum von natürlichem Isosakuranin (III)

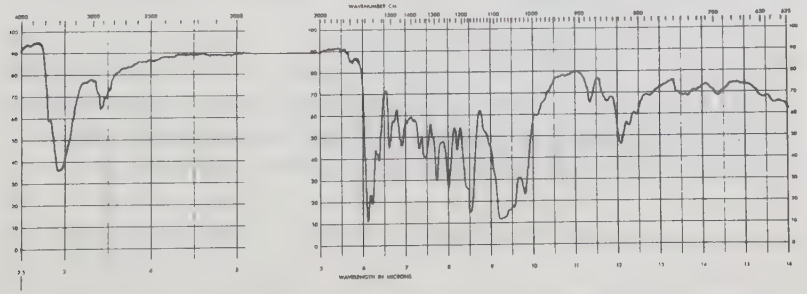


Abb. 8: IR-Spektrum von synthetischem Isosakuranin (III)

3. Synthese von 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7-β-[4-O-β-D-glucopyranosyl-D-glucopyranosid] (Isosakuranetin-7-β-cellobiosid)

Um Erfahrungen bei der Kupplung von Disacchariden mit Isosakuranetin zu gewinnen, synthetisierten wir zunächst Isosakuranetin-cellobiosid. Die Glykosidierung des Aglykons mit α-Acetobromcellobiose[87] erfolgte mit Silbercarbonat in Chinolin und Chloroform als Lösungsmittel. Die Umsetzung des Isosakuranetins gelang in so hohem Maße, daß das Kupplungsprodukt ohne chromatographische Reinigung vom Aglykon in 60% Ausbeute aus Methanol kristallisiert werden konnte. Das erhaltene Isosakuranetincellobiosylheptaacetat lieferte durch Verseifen mit 1.8 m Natriummethylatlösung bei 0° kristallines Isosakuranetincellobiosid in nahezu 80%iger Ausbeute. Versuche mit und ohne Zusatz von absolutem Chloroform ergaben, daß geringe Mengen dieses Lösungsmittels ohne störenden Einfluß auf die Glykosidierung blieben. Infolge der verbesserten Löslichkeit der Komponenten wurde sogar die Ausbeute gesteigert.

4. Synthese von 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7-β-[6-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid] (Isosakuranetin-7-β-rutinosid = DIDYMIN)

In der Reihe der Flavanon-7-rutinoside wurde bisher nur Hesperidin, das 5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7-rutinosid, synthetisiert. ZEMPLEN u. Mitarb.[86] kuppelten dabei Hesperetin und α-Acetobromrutinose mit Silberoxid als Katalysator in Chinolin als Lösungsmittel. Sie erhielten Hesperidin in etwa 20% Ausbeute. Der Versuch, das Glykosid aus Phloracetophenonglykosid über das entsprechende Chalkonglykosid darzustellen, mißlang den genannten Autoren. Wir entschlossen uns daher, das Didymin durch Direktkupplung zu synthetisieren.

Analog der Cellobiosidsynthese kuppelten wir Isosakuranetin und α-Acetobromrutinose (dargestellt nach ZEMPLEN[31]) in einem Chloroform-Chinolin-Gemisch mit Silbercarbonat als Katalysator zum Isosakuranetin-7-rutinosylhexaacetat. Das Kupplungsprodukt konnte nach Chromatographie an einer Silicagelsäule mit Toluol-Äthylacetat (8:3) als Elutionsmittel in 51% Ausbeute kristallin erhalten werden. Die Verseifung gelang mit 1,8 m Natriummethylatlösung bei 0° in 20 Minuten. Das entstandene Isosakuranetin-rutinosid (I) mußte auf einer Silicagelsäule mit Äthylacetat-Methanol-Wasser (80:14:10) gereinigt werden. Wir erhielten das Glykosid kristallin aus verdünntem Methanol in knapp 80%iger Ausbeute (Schmp. 209 - 211°). Das Glykosid war in allen Kriterien mit dem aus Monarda didyma L. isolierten Didymin (I) identisch.

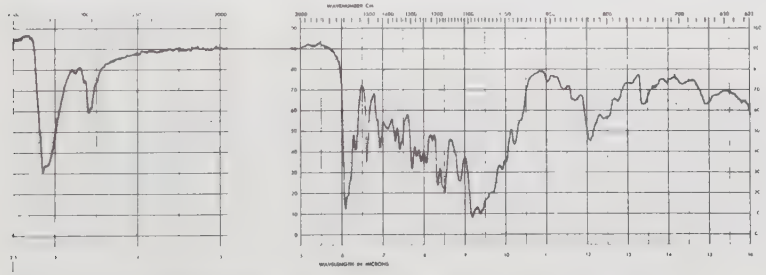


Abb. 9: IR-Spektrum von natürlichem Didymin (I)

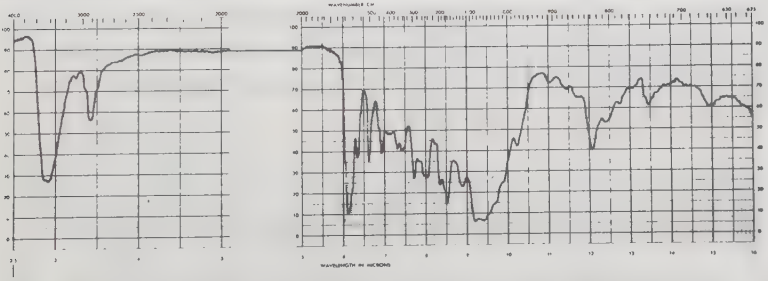


Abb. 10: IR-Spektrum von synthetischem Didymin (I)

Das durch Acetylierung gewonnene Didyminheptaacetat (Ib) vom Schmp. 116 - 119° war gleichfalls in jeder Beziehung mit dem durch Synthese dargestellten Isosakuranetin-7-β-rutinosylhepta-acetat identisch. (KMR-Spektrum siehe Abb. 2, S. 44).
Damit war der endgültige Konstitutionsbeweis des Didymins durch Synthese gelungen.

V. SYNTHESE DES NARINGENIN-RUTINOSIDES NARIRUTIN

Synthese von Glykosiden des 5,7,4'-Trihydroxy-flavanons (Naringenin)

Naringenin + α-Acetobromcellobiose ⟶ Naringenin-7-cellobiosid

Naringenin + α-Acetobromrutinose ⟶ Naringenin-7-rutinosid (Narirutin)

Naringenin, ein 5,7,4'-Trihydroxy-flavanon wurde erstmals von SHINODA u. SATO[88] vor etwa 40 Jahren synthetisiert. Aus Naringin erhielt es WILL[89] im Jahre 1885. Naringin selbst, ein Neohesperidosid des Naringenins, wurde 1857 von DE VRY[90] erstmals isoliert. KAMI_YA u. Mitarb.[91] konnten 1966 dieses Glykosid synthetisieren. Als weitere Glykoside des Naringenins wurden u.a. das 7-Glucosid (Prunin)[92], das Naringenin-7-rutinosid[20], und die Triglykoside 4'-β-Glucosyl-7-β-rutinosyl-naringenin und 4'-β-Glucosyl-7-β-neohesperidosyl-naringenin[93] isoliert. Nur Prunin wurde 1953 von FOX u. Mitarb.[79] synthetisiert. Für die übrigen Verbindungen stand der Konstitutionsbeweis durch Synthese noch aus.

1. Synthese von 5,7,4'-Trihydroxy-flavanon-7-β-[4-O-β-D-glucopyranosyl-D-glucopyranosid] (Naringenin-7-cellobiosid)

Da im Naringenin zwei freie Hydroxylgruppen vorliegen, versuchten wir wieder, zunächst das Naringenin-7-cellobiosid

zu synthetisieren. Wir kuppelten Naringenin und α-Acetobrom-cellobiose im molaren Verhältnis von 1 : 0.9 wiederum mit Silbercarbonat in einem Chloroform-Chinolin-Gemisch. Es gelang, mit dieser Menge die C_7-Hydroxylgruppe des Naringenins selektiv zu glykosidieren. Nach chromatographischer Abtrennung des Aglykons über eine Silicagelsäule erhielten wir das Naringenin-7-cellobiosylheptaacetat in nahezu 50%iger Ausbeute. Nach Verseifen dieses Acetates mit Natriummethylatlösung erhielten wir kristallines Naringenin-7-β-cellobiosid vom Schmp. 213 - 216°. Es kristallisierte aus verdünntem Methanol in fast 80%iger Ausbeute.

2. Synthese von 5,7,4'-Trihydroxy-flavanon-7-β-[6-O-α-L-rhamno-pyranosyl-D-glucopyranosid] (Naringenin-7-rutinosid = NARIRUTIN)

Die Glykosidierung des Naringenins mit α-Acetobromrutinose (1: 0.9 molar) erfolgte mit Chinolin und Silbercarbonat. Die Zugabe von Drierite als wasserentziehendes Mittel erwies sich, wie bei allen Glykosidierungen mit Chinolin und Silbercarbonat, als vorteilhaft. Nicht umgesetztes Aglykon wurde über Silicagelsäulen abgetrennt. Auch in diesem Falle war die selektive Glykosidierung des C_7-Hydroxyls möglich. Das N a r i n g e n i n - 7 - r u t i n o s y l - h e x a a c e t a t (Va) wurde in 68%iger Ausbeute erhalten.

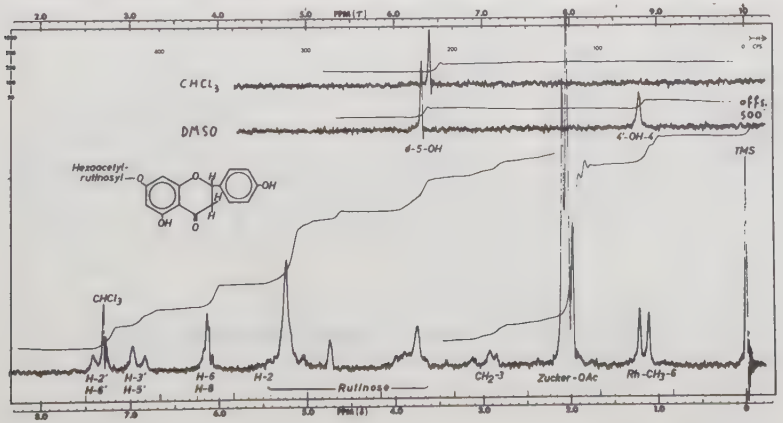


Abb. 11: KMR-Spektrum des Naringenin-7-rutinosylhexaacetates (Va)

Zur vollständigen E n t a c e t y l i e r u n g wurde Naringeninrutinosylhexaacetat mit 1.8 m Natriummethylatlösung über Nacht im Kühlschrank stehen gelassen. Da Naringenin-7-rutinosid nicht sofort kristallin ausfiel, reinigten wir das Verseifungsprodukt über Polyamidsäulen mit verdünntem Methanol als Elutionsmittel. Anschließend erwies sich eine weitere Reinigung über Silicagelsäulen zur Abtrennung von Polyamid als erforderlich. Wir erhielten analysenreines, aber zunächst noch amorphes Naringeninrutinosid. Die Kristallisation gelang später durch Tiefkühlung, allerdings in nur kleiner Menge (Schmp.: 160 - 165°) Ähnliche Schwierigkeiten hatten GENTILI u. HOROWITZ[20] auch beim natürlichen Naringenin-7-rutinosid. Es wird als feste, schwach gelb gefärbte Masse beschrieben. Wir schlagen für das Naringenin-7-β-rutinosid (V) den Namen N a r i r u t i n vor. Die Analysen und Spektren des synthetisierten Narirutins (V) sowie seines durch Acetylierung gewonnenen Octaacetates (Vb) beweisen das Vorliegen eines 5,7,4'-Trihydroxy-flavanon-7-β-[6-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosides]. Natürliche Vergleichssubstanz konnten wir nicht erhalten, doch spricht ein Vergleich der von GENTILI u. HOROWITZ[20] angegebenen Eigenschaften mit denen unseres synthetischen Glykosides - nicht bitterer Geschmack, schlechte Kristallisierbarkeit, UV-Maxima bei 283 und 330 mμ und chromatographisches Verhalten im Vergleich zu Naringin für die Identität.

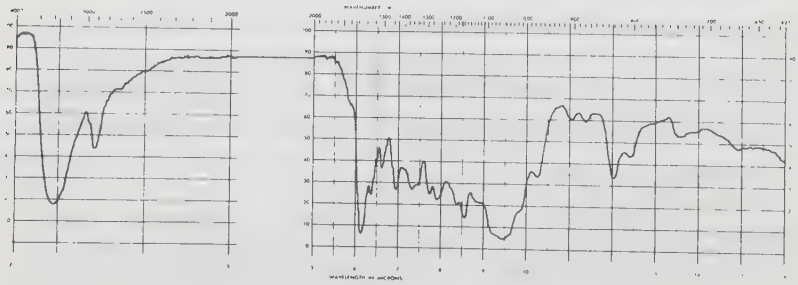


Abb. 12: IR-Spektrum von synthetischem Narirutin (V)

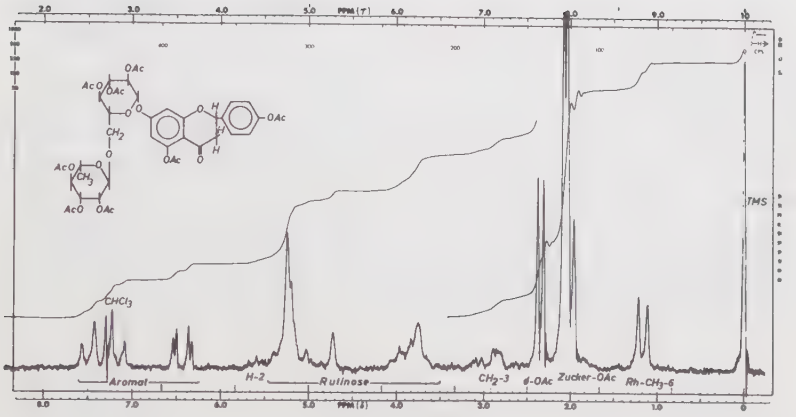
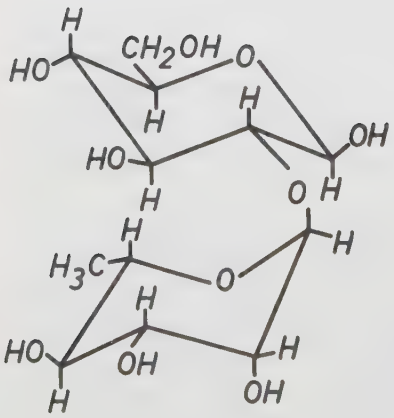


Abb. 13

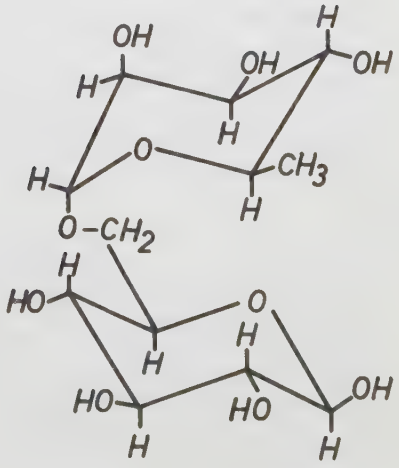
KMR-Spektrum von Narirutinoctaacetat (Vb)

VI. SYNTHESE DES ISOSAKURANETIN-NEOHESPERIDOSIDES PONCIRIN

Während die Rutinose schon 1934 von ZEMPLEN u. GERECS[82] synthetisiert wurde, gelang die Synthese der mit ihr isomeren Neohesperidose erst 1964 durch HOROWITZ u. Mitarb.[94]. Nach den Angaben der Autoren war das ausgearbeitete Verfahren aber für die Darstellung von Neohesperidosiden noch unbrauchbar. Die erste rationelle Methode entwickelten kürzlich KAMIYA u. Mitarb.[95]. Sie gingen von 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-α-D-glucopyranose und α-Acetobromrhamnose aus und konnten über die α-Acetobromneohesperidose erstmals das Naringenin-neohesperidosid Naringin synthetisch herstellen.



2-O-α-L-Rhamnopyranosyl-D-glucopyranose (β-Neohesperidose)



6-O-α-L-Rhamnopyranosyl-D-glucopyranose (β-Rutinose)

1. Synthese von β-Neohesperidose-heptaacetat und α-Acetobrom-neohesperidose

Wir synthetisierten das Neohesperidoseheptaacetat nach einem von Prof. Koeppen in unserem Laboratorium entwickelten Verfahren[96] durch Kupplung von 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranose mit α-Acetobromrhamnose.

Die Darstellung von 2,3,4-TRI-O-ACETYL-α-L-RHAMNOPYRANOSYL-BROMID (α-ACETOBROMRHAMNOSE) erfolgte nach FISCHER u. Mitarb.[97].

Zur Darstellung der 1,3,4,6-TETRA-O-ACETYL-β-D-GLUCOPYRANOSE acetylierten wir Glucose mit Natriumacetat als Katalysator zum β-D-Glucosepentaacetat[98] und setzten mit Phosphorpentachlorid in Tetrachlorkohlenstoff nach LEMIEUX[99] zum 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-O-trichloracetyl-β-D-glucopyranosyl-chlorid um. Mit ammoniakalischem Äther erhielten wir hieraus 3,4,6-Tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosylchlorid[99]. Die Umwandlung der β-Chlorverbindung in das 3,4,6-Tri-O-acetyl-α-D-glucopyranosylchlorid wurde nach LEMIEUX[100] in absolutem Aceton ausgeführt. Die 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranose erhält man schließlich nach LEMIEUX[100] aus dem α-Chlorid durch Acetylierung mit Silberacetat in Eisessig. Bezogen auf das Glucosepentaacetat betrug die Ausbeute an 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranose etwa 14.5%.

Die Kondensation von 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranose mit 2,3,4-Tri-O-acetyl-α-L-rhamnopyranosylbromid zum β-ACETYL-2-O-α-L-(2,3,4-TRI-O-ACETYL)-RHAMNOPYRANOSYL- 3,4,6-TRI-O-ACETYL-D-GLUCOPYRANOSID (β-NEOHESPERIDOSEHEPTAACETAT) führten wir nach HELFERICH u. ZIRNER[101] mit Hilfe von Quecksilbercyanid und Quecksilberbromid in Acetonitril durch. Quecksilbercyanid dient dabei als Kondensationsmittel, das Bromid als Katalysator. Acetonitril löst alle Bestandteile und ermöglicht ein

homogenes Medium. Dabei wird die 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-glucose weder durch Acetonitril noch durch die Quecksilbersalze in das anomere α-Acetylglucosid konvertiert; man erhält daher β-Neohesperidoseheptaacetat. Das Acetat wurde in 55%iger Ausbeute aus verdünntem Äthanol kristallisiert.

Versuche, auch das daraus mit HBr in Eisessig dargestellte Hexaacetyl-α-neohesperidosylbromid (α-Acetobromneohesperidose) kristallin zu erhalten, waren wie bei KAMIYA[95] erfolglos. Da die α-Acetobromneohesperidose aber chromatographisch praktisch rein war, lösten wir die sirupöse Verbindung in absolutem Chloroform oder Aceton und verwendeten sie direkt zu den Glykosidsynthesen.

Zur Chromatographie der Acetobromzucker von Rutinose und Neohesperidose sowie ihrer Heptaacetate verwendeten wir wasserfreies Benzol-Methanol (8:2) auf aktivierten Kieselgelplatten. Die chromatographierten Neohesperidosederivate haben dabei einen höheren R_f-Wert als die analogen Rutinosederivate.

2. Synthese von 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7-β-[2-O-α-L-rhamnopyranosido-D-glucopyranosid] (Isosakuranetin-7-β-neohesperidosid = PONCIRIN)

Von den natürlich vorkommenden Neohesperidosiden der Flavanon- und Flavonreihe wurden bisher nur Neohesperidin und Naringin synthetisch dargestellt. CHOPIN u. DELLAMONICA[102] synthetisierten Neohesperidin, indem sie durch Alkaliabbau von Naringin das Phloroacetophenon-4-neohesperidosid darstellten, dieses mit p-Oxybenzoesäure zum Neohesperidinchalkon umsetzten und schließlich durch Ringschluß in das Neohesperidin überführten.

Die erste Totalsynthese von Neohesperidin und Naringin gelang KAMIYA u. Mitarb.[91]. Sie erhielten durch Kupplung von α-Acetobromneohesperidose mit Phloroacetophenon das Phloroacetophenon-4-neohesperidosid. Die Ausbeute war mit 2.1% recht unbefriedi-

gend. Vermutlich entstanden auch bei dieser Umsetzung in erster Linie die Phloroacetophenon-2-4-diglykoside (siehe PACHECO u. GROUILLER[80]). Das Phloroacetophenonglykosid wurde mit den entsprechenden Aldehyden zu Chalkonglykosiden gekuppelt. Durch Ringschluß wurden Neohesperidin und Naringin erhalten. Wie KAMIYA u. Mitarb.[91] ausdrücklich betonen, gelang es ihnen nicht, das Isosakuranetin-neohesperidosid (Poncirin) auf die gleiche Weise über das Chalkonglykosid zu synthetisieren.

a) Partielle Methylierung von Naringin zu Poncirin

Zur Gewinnung von Testsubstanz methylierten wir zunächst natürliches Naringin am $C_{4'}$-Hydroxyl, mit ätherischer Diazomethanlösung über Nacht bei $+5^{o}$. Ein Chromatogramm ergab neben Spuren von nicht umgesetztem Naringin einen deutlichen Poncirinfleck und darüberhinaus einige Flecke, die auf Teilmethylierungen am C_5 und im Zuckeranteil schließen ließen[103]. Die Abtrennung der Nebenprodukte gelang durch Kieselgel-Chromatographie mit Äthylacetat-Methanol-Wasser (80:14:10) als Elutionsmittel. Poncirin konnte in geringer Ausbeute aus absolutem Äthanol kristallisiert werden. Der Schmelzpunkt betrug 209 - 211^{o}.

b) Synthese von Poncirin aus Isosakuranetin und α-Acetobrom-neohesperidose

Analog der Didyminsynthese versuchten wir nach KOENIGS-KNORR[104] die Direktkupplung von Isosakuranetin (II) mit α-Acetobromneohesperidose in Chinolin und mit Silbercarbonat[86] als Katalysator. Wir stellten eine konzentrierte Acetobromneohesperidoselösung in Chloroform her und setzten mit dem in Chinolin gelösten Isosakuranetin um. Die Aufarbeitung erfolgte nach dreistündiger Reaktionszeit. Nach Entacetylierung des Kupplungsproduktes mußte das Poncirin über eine Kieselgelsäule gereinigt werden. Aus absolutem Äthanol erhielten wir Kristalle vom Schmp. 211 - 212^{o}. Die Ausbeute betrug etwas über 16% und war um über die Hälfte geringer als im Falle des Didymins.

Diese Synthese des Isosakuranetin-7-neohesperidosides (Poncirin) stellt - trotz der noch unbefriedigenden Ausbeute - die bisher rationellste Methode aller versuchten Totalsynthesen von Flavanon-neohesperidosiden dar.

c) Synthese von Poncirin über das Phloroacetophenonglykosid

Obwohl bereits KAMIYA[91] vergeblich versucht hatte, das Phloroacetophenon-4-neohesperidosid mit Anisaldehyd zum Chalkonglykosid zu kondensieren, wiederholten wir diesen Syntheseversuch ein zweites Mal.

α. Synthese von Phloroacetophenon-4-neohesperidosid

Da PACHECO u. GROUILLER[80] nachweisen konnten, daß bei der Kupplung von Phloroacetophenon mit einem Acetobromzucker im wesentlichen Phloroacetophenon-2-4-diglykoside und nicht, wie früher angenommen, -4-monoglykoside entstanden, gingen wir von 2-Benzoyl-phloroacetophenon aus. Es ist nach der Vorschrift von CANTER u. Mitarb.[105] leicht zugänglich.

In Anlehnung an die Methode von ZEMPLEN[106] wurde das 2-Benzoylderivat mit α-Acetobromneohesperidose in Aceton und mit 10%iger wässriger Kalilauge versetzt. Nach 25-stündiger Reaktionszeit wurde das Kupplungsprodukt verseift. Die Aufarbeitung ergab Phloroacetophenon-4-neohesperidosid. Es wurde in 18%iger und damit neunmal höherer Ausbeute als von KAMIYA[91] angegeben, erhalten.

Das erhaltene Glykosid war identisch mit dem aus Naringin durch Alkaliabbau erhaltenen Phloroacetophenon-4-neohesperidosid[36].

β. Synthese von 2',4',6'-Trihydroxy-4-methoxy-chalkon-4'-neohesperidosid (Poncirinchalkon)

Setzt man dieses Phloracetophenon-4-neohesperidosid mit Anisaldehyd in 60% Kalilauge in Stickstoffatmosphäre um, so erhält man aus der Reaktionsmischung das Phloroacetophenonglykosid wieder unverändert zurück. Den Grund für das Scheitern der Reaktion sehen wir vor allem darin, daß der schwer lösliche Anisaldehyd ein Zweiphasensystem verursacht.

Wir versuchten daraufhin andere, z.T. neue Kondensationsmethoden. In Reihenversuchen änderten wir Lösungsmittel und Katalysator. Die Ergebnisse wurden dünnschichtchromatographisch verfolgt.

Ein Versuch mit 60% Kalilauge und Dimethylsulfoxid führte zwar zu einem deutlichen Chalkonglykosidfleck, doch war noch etwa doppelt so viel nicht umgesetztes Phloroacetophenonglykosid vorhanden.
Ein Versuch mit 60% Kalilauge in Äthanol-Wasser (1:1) zeigte ein ähnliches Ergebnis.
Ein Versuch mit 12% Kaliumhydroxid in absolutem Äthanol brachte ein besseres Ergebnis. Das Verhältnis von Ausgangsmaterial zu dem gewünschten Chalkonglykosid war jetzt etwa 6:4.
Ein Versuch mit 25% Kaliumhydroxid in absolutem Äthanol ergab nur noch etwa ein Drittel Ausgangsmaterial und zwei Drittel Kupplungsprodukt.

In einem weiteren Versuch verwendeten wir gleiche Teile von Bariumoxid und Bariumhydroxid. Als Lösungsmittel für die Ausgangsmaterialien diente Dimethylformamid. DMF wird von Kalilauge zersetzt, ist aber bei Anwendung von Erdalkalihydroxiden stabil. In wasserfreiem Milieu gelang die Kupplung von überschüssigem Anisaldehyd und Phloroacetophenonglykosid überraschend gut. Einem Drittel Ausgangsmaterial standen zwei Drittel Chalkonglykosid gegenüber.

Damit war eine neue Möglichkeit der Kupplung von Acetophenonderivaten mit Aldehyden zu den entsprechenden Chalkonverbindungen gefunden.

Trotz dieser recht hohen Umsetzungsrate in DMF führten wir die Synthese des Chalkonglykosides mit 25% äthanol.Kaliumhydroxid durch, da wir hofften, aus wässrig-äthanolischer Lösung das Chalkonglykosid leichter kristallin zu erhalten als aus verdünntem DMF. Diese Überlegung erwies sich als richtig.
Das 2',4',6'-Trihydroxy-4-methoxy-chalkon-4'-neohesperidosid (Poncirinchalkon, VI) ließ sich nach Verdünnen der Reaktionsmischung mit Wasser und Ansäuern mit Salzsäure ohne chromatogra-

phische Abtrennung des wasserlöslichen Ausgangsmaterials kristallin gewinnen. Die Ausbeute betrug etwa 40%. Die Mutterlauge enthielt chromatographisch etwa gleiche Mengen Chalkonglykosid und Ausgangsmaterial. Durch säulenchromatographische Trennung kann daher die Ausbeute noch verbessert werden.

Der Schmelzpunkt des Chalkonglykosides war mit 198 - 201° recht scharf. Die von KAMIYA[91] dargestellten Chalkonglykoside des Naringins und Neohesperidins hatten Schmelzintervalle von 15 bis 20°. Interessanterweise war das Poncirinchalkon in verdünnten organischen Lösungsmitteln schwerer löslich als das Poncirin. Dagegen sind normalerweise Flavanonglykoside schwerer löslich als ihre isomeren Chalkonglykoside.

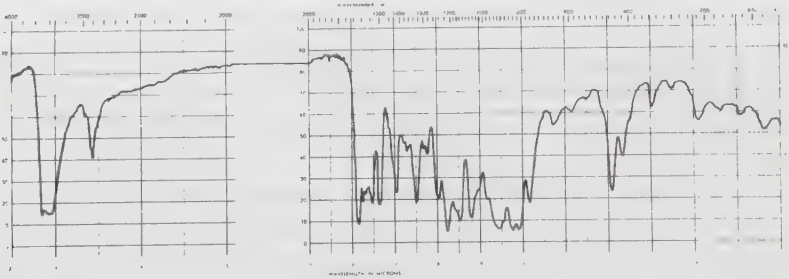


Abb. 14: IR-Spektrum von Poncirinchalkon (VI)

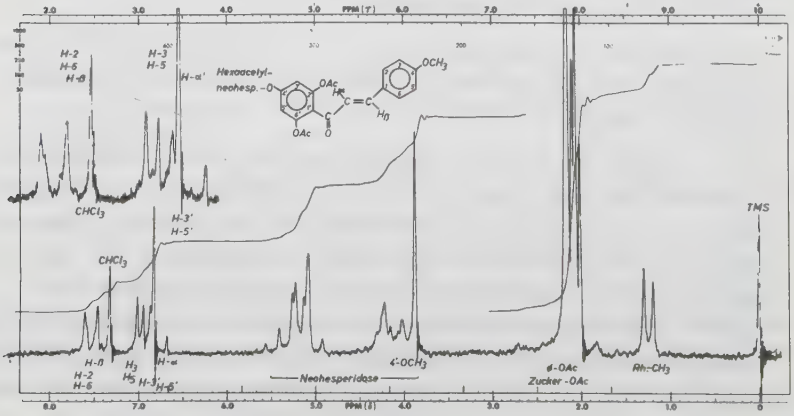


Abb. 15: KMR-Spektrum von Poncirinchalkonoctaacetat (VIa)

γ. Zyklisierung von 2',4',6'-Trihydroxy-4-methoxy-chalkon-4'-neohesperidosid zu Isosakuranetin-7-β-neohesperidosid (Poncirin)

Die Zyklisierung des Poncirinchalkonglykosides (VI) gelang zum größten Teil durch einfaches Erhitzen mit Wasser. Durch Zusatz von Natriumacetat verlief die Zyklisierung nach fünfminütigem Erhitzen nahezu quantitativ. Als noch vorteilhafter erwies sich die Zyklisierung in wässrigem Pyridin. Auf diese Weise konnten auch die Mutterlaugen nahezu quantitativ auf Poncirin aufgearbeitet werden. Nach Abdestillation des wässrigen Pyridins mit Hilfe von Äthanol und Umlösen des Rückstandes in absolutem Äthanol erhielten wir kristallines Poncirin (IV) in 72%iger Ausbeute. Die in der Mutterlauge noch befindlichen Poncirinmengen wurden nach Entfernen des Lösungsmittels direkt zum Poncirinheptaacetat (IVa) acetyliert.

Damit war die Synthese des Poncirins auf drei verschiedenen Wegen gelungen. Die weitaus beste Ausbeute ergab die Direktkupplung von Isosakuranetin mit α-Acetobromneohesperidose. Das auf verschiedene Weise dargestellte Poncirin war in jeder Beziehung identisch mit dem natürlichen Glykosid. Ein Mischschmelzpunkt ergab keine Depression. Ein uns von HOROWITZ übersandtes IR-Spektrum bestätigte die Identität. Eine von SHIMOKORIYAMA neuerdings aus Poncirus trifoliata isolierte, als "Poncirin" bezeichnete[107] und uns übersandte Substanz erwies sich dagegen mit Didymin identisch. Für ein weiteres aus Poncirus trifoliata isoliertes Isosakuranetin-rhamnoglucosid schlägt SHIMOKORIYAMA[107] den Namen "N e o p o n c i r i n" vor. Beide Glykoside führte der Autor in die analogen Flavonglykoside über. Aus "Poncirin" entstand dabei ein Glykosid von ähnlichem Schmelzpunkt wie Linarin (Acacetin-7-rutinosid). Aus "Neoponcirin" erhielt er ein Glykosid mit ähnlichem Schmp. wie Fortunellin (Acacetin-7-neohesperidosid). Offensichtlich ist damit das "Neoponcirin" identisch mit dem allgemein als Poncirin bezeichneten Isosakuranetin-7-β-neohesperidosid.

Durch unsere Synthese war der endgültige Beweis erbracht, daß das von HOROWITZ[36] aus Citrus paradisi isolierte und als Poncirin bezeichnete Isosakuranetin-7-rhamnoglucosid ein 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7-β-[2-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucosid] ist.

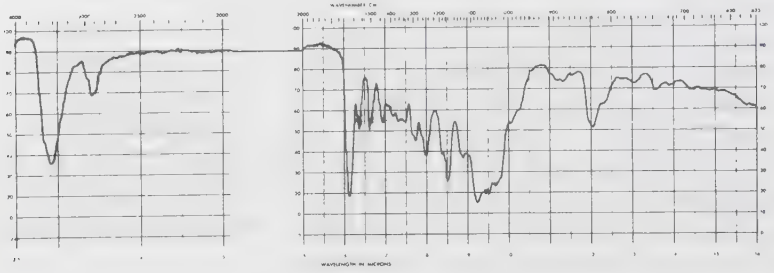


Abb. 16

IR-Spektrum von natürlichem Poncirin (IV)*)

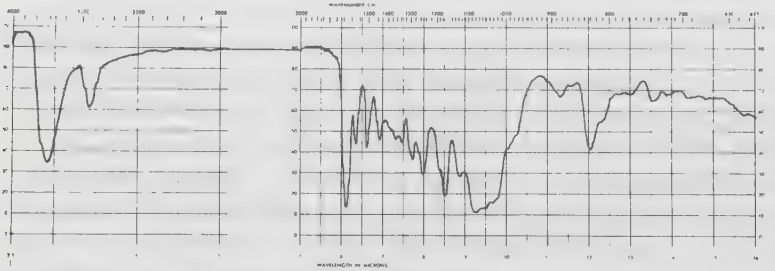


Abb. 17

IR-Spektrum von synthetischem Poncirin (IV)

KMR-Spektrum von synthetischem Poncirinacetat (IVa) siehe Abb. 3, S. 44.

*) Für die Übersendung von Testsubstanz danken wir Herrn Professor Dr. R. HOROWITZ, Pasadena U.S.A.

VII. IDENTITÄTSBEWEIS VON ACACIIN AUS ROBINIA PSEUDOACACIA L. MIT LINARIN, EINEM ACACETIN-7-RUTINOSID AUS LINARIA VULGARIS MILL.

Acacetinglykoside kommen in der Natur nicht sehr häufig vor. Über die Isolierung des Aglykons berichtet erstmals PERKIN[108] im Jahre 1900. Das Glykosid "Linarsäure"[109] wurde 1904, das Glykosid Linarin[110] 1907, das Glykosid Buddleoflavonolosid[111] 1933 isoliert. Alle drei Verbindungen erwiesen sich später untereinander als identisch. Heute kennt man das 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavon-7-β-rutinosid (Acacetin-7-rutinosid) unter dem Namen L i n a r i n [112][113]. Die Synthese des Linarins gelang ZEMPLEN u. Mitarb.[114] im Jahre 1943. Über ein Acacetin-7-rhamnoglucosid aus Robinia pseudoacacia L., das von Linarin verschieden sein sollte, berichtete HATTORI im Jahre 1926[115]. Bei der Untersuchung durch ZEMPLEN u. MESTER[116] stellte sich heraus, daß das Acaciin (Schmp. 264 - 265°) im Mischschmp. mit Linarin eine Depression von 8° ergab. MATSUNO[117] berichtete 1958 über die Isolierung eines Acacetin-7-rhamnoglucosides vom Schmp. 213 - 215° aus Fortunellaarten. Da dieses als Fortunellin bezeichnete Glykosid mit einem durch Dehydrierung von Poncirin dargestellten Flavonglykosid im Schmelzpunkt identisch war, sollte es sich um ein Acacetin-7-neohesperidosid handeln.

Um zu klären, worin sich Acaciin von Linarin und Fortunellin unterscheidet, isolierten wir Acaciin erneut aus den Blättern von Robinia pseudoacacia L.

Wir hielten uns bei der Isolierung im Prinzip an die Methode von ZEMPLEN u. MESTER[116]. Wir erhielten nach der Bleiacetatfällung ein Filtrat, aus dem bei 0° das Rohacaciin ausfiel. Es bestand chromatographisch aus vier Flavonglykosiden. Dieses Rohacaciin wurde in Wasser gelöst und durch Ausschütteln mit Chloroform von lipophileren Verunreinigungen gereinigt. Anschließend wurde Acaciin selbst mit Äthylacetat ausgeschüt-

telt. Aus Methanol erhielten wir amorphes Acaciin (VII). Dabei zeigte sich, daß das Acaciin durch Umkristallisieren aus verschiedenen, von ZEMPLEN u. MESTER[116] beschriebenen Lösungsmitteln (wässriges Pyridin, Essigsäure oder Alkohol) nicht von drei weiteren, etwas hydrophileren Glykosiden (vermutlich Triglykosiden) abtrennen ließ. Stets waren diese Begleitglykoside in geringer Konzentration im Kristallisat enthalten. Mit Hilfe der Säulenchromatographie ließ sich das erhaltene Acaciin leicht reinigen. Wir chromatographierten mit Äthylacetat-Methanol-Wasser (80:14:10) auf Kieselgelsäulen. Die ersten gelblich gefärbten Fraktionen enthielten reines Acaciin. Es kristallisierte aus Methanol in weißen Nadeln. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus wässrigem Pyridin schmolz Acaciin scharf bei 275 - 276°. Es hatte einen um 10° höheren Schmelzpunkt, als von ZEMPLEN u. MESTER[116] beschrieben. Da dieser Schmelzpunkt praktisch mit dem von gereinigtem natürlichen Linarin aus Linaria vulgaris und mit dem von synthetischem Linarin (VIII) übereinstimmte, führten wir einen Mischschmelzpunkt und einen IR-Spektrenvergleich durch. Beide Vergleiche ergaben, daß Acaciin und Linarin identisch sein mußten.
Der letzte Zweifel an einer Identität beider Verbindungen konnte durch Vergleich der optischen Drehungen, der KMR-Spektren und der beiden Glykosidacetate beseitigt werden (s.Tab.3). KMR-Spektren der Glykosidacetate auf Seite 72.

T a b e l l e 3

Substanz	Schmp.	opt.Rot. in Pyridin	Acetat-Schmp.
Acaciin	275-276°	$[\alpha]_D = -90.3°$	123-125°
Linarin synth.	275-277°	$[\alpha]_D = -88.2°$	123-125°
Linarin natürl.	275-277°	$[\alpha]_D = -87.0°$	123-125°

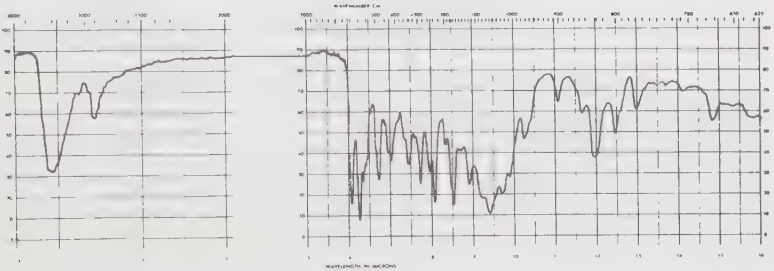


Abb. 18

IR-Spektrum von Acaciin (VII)

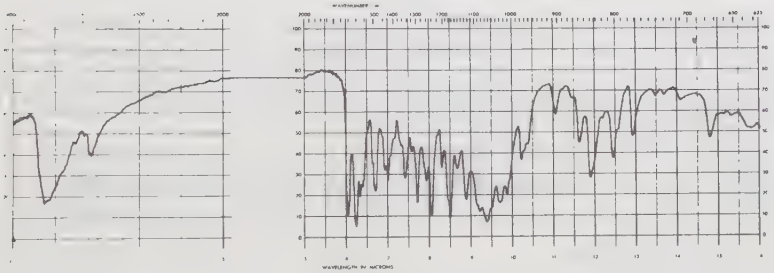


Abb. 19

IR-Spektrum von Linarin (VIII)

Der Name Acaciin ist daher durch Linarin zu ersetzen. [Linarin ist ein 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavon-7-β-D-6-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid].

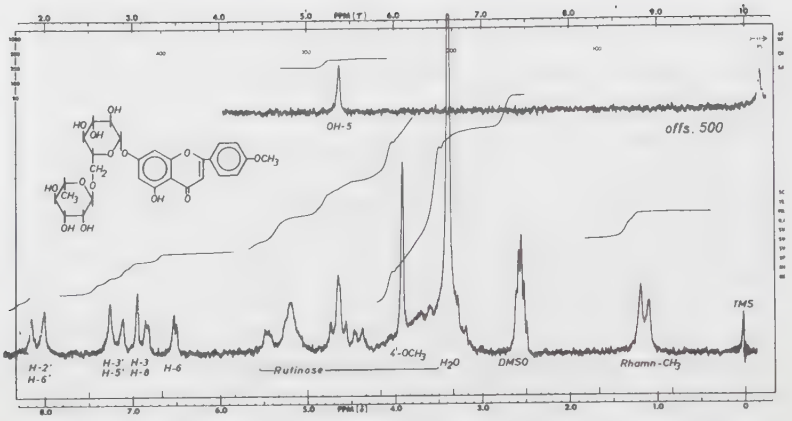


Abb. 20

KMR-Spektrum von synth. Linarin (= Acaciin) in DMSO

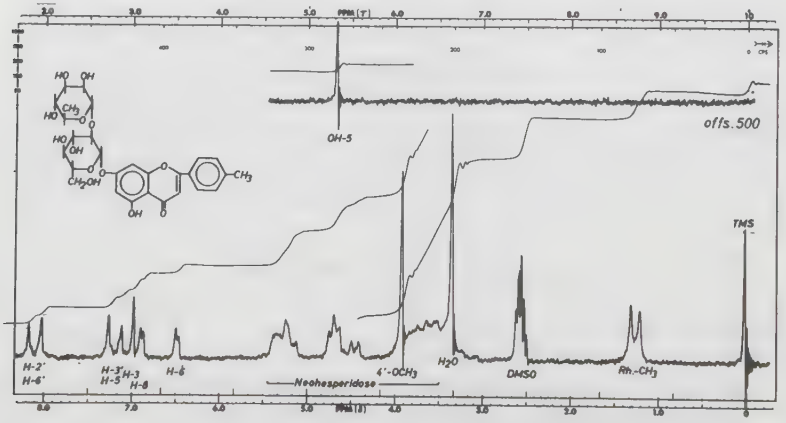


Abb. 21

KMR-Spektrum von synth. Fortunellin in DMSO

VIII. DEHYDRIERUNG VON FLAVANON-7-O-RHAMNOGLUCOSIDEN ZU DEN STRUKTURANALOGEN FLAVONGLYKOSIDEN

Seit KOSTANECKI[118] 1899 die Dehydrierung eines Flavanons zum Flavon mittels Brom in Schwefelkohlenstoff beschrieb, sind die Methoden zur Dehydrierung mehrfach verbessert worden. Mehreren Methoden ist gemeinsam, daß sie nur für Aglykone oder deren Acetate anwendbar sind. Flavanonglykoside können nach Kaschieren der Hydroxylgruppen durch Acetylierung dehydriert werden. ZEMPLEN u. BOGNAR[119] konnten durch Einwirken von Brom unter UV-Bestrahlung die 3-Bromverbindung des Hesperidinacetates gewinnen und mit Lauge in Diosmin überführen. Die Ausbeute war nicht befriedigend. Durch Einführen von N-Bromsuccinimid und Benzoylperoxid[120] ließ sich die Dehydrierungsmethode verbessern. Gute Ausbeuten bei der Dehydrierung von Flavanonglykosiden lassen sich mit der Methode von MAHESH u. SESHADRI[121] erzielen. Dabei wird das Flavanonglykosidacetat in Eisessig mit Jod in Gegenwart einer schwachen Base in das Flavonglykosidacetat übergeführt. Vermutlich wird dabei intermdiär die 3-Jod-Verbindung des Flavanons gebildet. Diese wird durch Abspaltung von Jodwasserstoff mittels der zugesetzten Base in das Flavonacetat übergeführt.

Wir modifizierten das Verfahren von MAHESH u. SESHADRI[121] und dehydrierten die Flavanonrhamnoglucosidacetate mit Jod, Eisessig, Acetanhydrid und Kaliumacetat. Der zugesetzte Acetanhydrid sollte eine mögliche Entacetylierung unterbinden. Die erreichten Ausbeuten an freiem Glykosid lagenin der Regel zwischen 50 und 60%.

1. Dehydrierung von Rhamnoglucosiden des Isosakuranetins zu Acacetin-7-rhamnoglucosiden

(Überführung von Didymin in Linarin und von Poncirin in Fortunellin)

MATSUNO[117] berichtete 1958, daß ihm die Überführung von

Poncirin in das entsprechende Flavonglykosid Fortunellin gelungen sei. Diese Mitteilung wurde bisher aber durch keine experimentellen Angaben belegt.

Wir dehydrierten die Didymin- und Poncirin-acetate jeweils etwa 24 Stdn. bei 120°. Durch Gießen der abgekühlten Reaktionsmischung in Kaliumjodid-haltiges Eiswasser wurde überschüssiges Jod als Jodkaliumjodidkomplex gelöst und gleichzeitig das Acetat ausgefällt.

Die Umsetzung der Flavanonglykoside in die Flavonderivate gelang nicht quantitativ. Verlängerung der Reaktionsdauer, ebenso wie weitere Zugabe von Jod oder Kaliumacetat veränderten das einmal erreichte Gleichgewicht nur wenig.
Das Maß der Umsetzung ließ sich chromatographisch sehr gut verfolgen. Wir chromatographierten auf Kieselgelplatten mit Äther-Toluol (2:1) und besprühten anschließend mit Schwefelsäure. Nach Erhitzen zeigten sich die Flavanonglykosidacetate als grauschwarze Flecken im R_f-Bereich von 0.45 bis 0.50. Die Flavonderivate waren gut abgetrennt als grünschwarze Flecken im R_f-Bereich von 0.20 bis 0.25 sichtbar.

Die schwerer löslichen Flavonglykoside kristallisierten nach Entacetylierung mit Natriummethylatlösung aus verdünntem Alkohol gut aus. Im Falle des Linarins gelang die Reinigung vom Didymin, das ähnliche Löslichkeit zeigt, erst nach mehrmaligem Umkristallisieren. Die Ausbeute an völlig reinem Linarin betrug daher nur 18%. Der Schmelzpunkt des erhaltenen Linarins lag bei 275 - 277°. ZEMPLEN's Syntheseprodukt hatte einen Schmp. von 265°. Bisher angegebener höchster Schmp. 274 - 276° (PLOUVIER [122]).Das synthetisierte Linarin war in jeder Beziehung identisch mit natürlicher Substanz.

Dagegen konnte das Acacetin-7-neohesperidosid aus Poncirin in 60% Ausbeute gewonnen werden. Es war im IR-Spektrum und im chromatographischen Verhalten identisch mit authentischem Fortunellin[117]. Ein Mischschmelzpunkt war nicht möglich, da das

zur Verfügung stehende Fortunellin amorph war und einen zu tiefen Schmelzbereich aufwies. Unser Glykosid zeigte mit 219 - 220° einen um 5° höheren Schmelzpunkt als die Literaturangabe.

Da das Vorliegen eines Neohesperidosides im Fortunellin bisher nur auf Analogieschlüssen beruhte, war mit der Totalsynthese erstmals eindeutig bewiesen, daß Fortunellin tatsächlich ein 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavon-7-β-[2-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-gluco pyranosid] ist.

Durch Acetylierung der beiden Flavonglykoside erhielten wir Linarinheptaacetat (VIIIa) und Fortunellinheptaacetat (Xa). Die KMR-Spektren werden nachstehend wiedergegeben. (S.72 u.73).

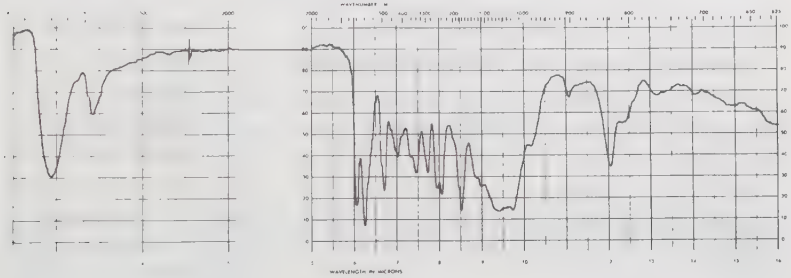


Abb. 22: IR-Spektrum von natürlichem Fortunellin (X)

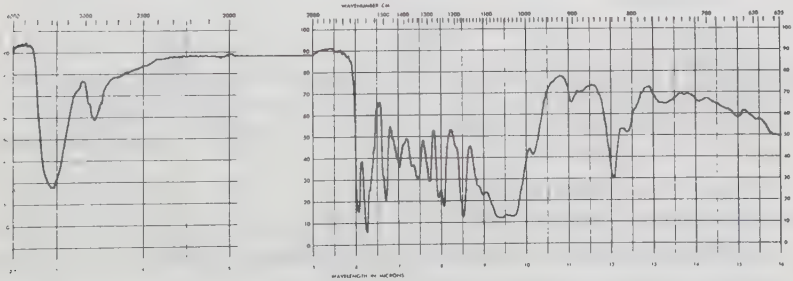


Abb. 23: IR-Spektrum von synthetischem Fortunellin (X)

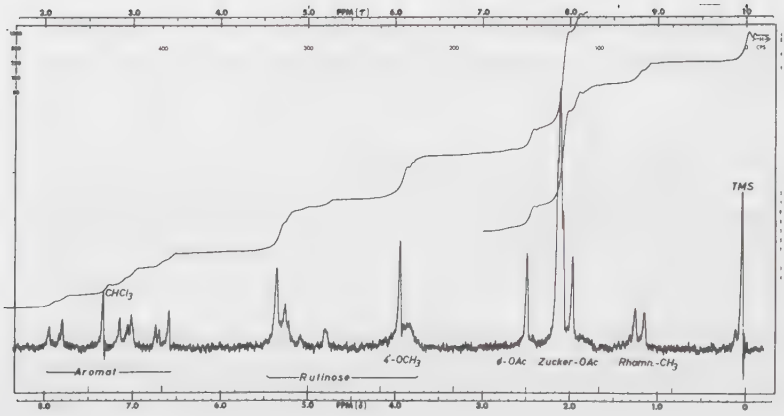


Abb. 24

KMR-Spektrum des Acetates von Acaciin (VIIa)

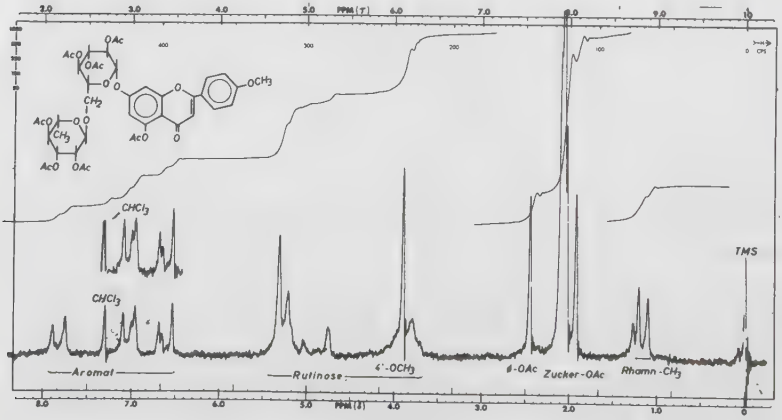


Abb. 25

KMR-Spektrum des Acetates von Linarin (VIIIa)

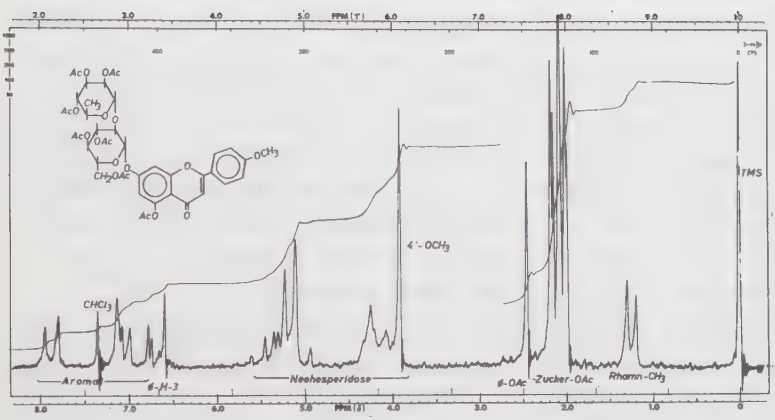


Abb. 26

KMR-Spektrum des Acetates von Fortunellin (Xa)

2. Dehydrierung von Rhamnoglucosiden des Naringenins zu Apigenin-7-rhamnoglucosiden

(Überführung von Narirutin in Isorhoifolin und von Naringin in Rhoifolin)

Die Dehydrierung von Naringin gelang bereits 1949 SESHADRI[123] und wenig später LORETTE und Mitarb.[120]. Lorette erhielt dabei ein Rohprodukt in etwa 54% Ausbeute, mußte das Glykosid aber wegen des hohen Aschegehaltes noch über eine Ionenaustauschersäule reinigen.

Wir dehydrierten die beiden Naringeninglykoside in Form ihrer Acetate, wie oben beschrieben, mit Jod und Kaliumacetat in Eisessig. Nach Entacetylierung und Umkristallisieren erhielten wir reines Apigenin-7-rutinosid (IX) in 57% Ausbeute, reines Apigenin-7-neohesperidosid (XI) in 48% Ausbeute. Der Schmp. des Neohesperidosides war mit 200 - 205° etwas höher als bei

LORETTE[120] (195 - 200°) und SESHADRI[123] (198-200°).

Apigenin-7-rutinosid wurde kürzlich von LITVINENKO u. Mitarb.[124] aus dem Blatt von Mentha piperita isoliert. LITVINENKO nennt dieses Glykosid Isorhoifolin. Isorhoifolin konnte zwar bisher mit unserem synthetischen Apigenin-7-rutinosid noch nicht verglichen werden, doch sprechen die von den Autoren beschriebenen physikalischen Eigenschaften für die Identität beider Verbindungen. Beide Substanzen kristallisieren zum Unterschied von Rhoifolin aus verdünntem Methanol.
Sie ergeben einen scharfen Schmelzpunkt von 269 - 270°.

Die optische Drehung für Apigenin-7-rutinosid wurde mit $[\alpha]_D$ = -91.1° (DMF) bestimmt. Praktisch identisch damit ist der Wert von $[\alpha]_D$ = -92° (DMF) für Isorhoifolin.

Mit der Darstellung von 5,7,4'-Trihydroxy-flavanon-7-β-[6-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid] (Apigenin-7-rutinosid) gelang damit die Totalsynthese eines neuen, natürlichen Apigeninglykosides.

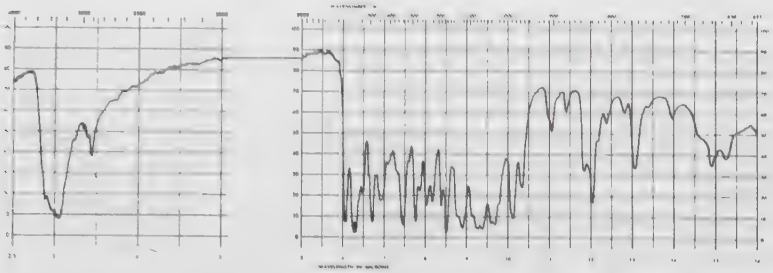


Abb. 27

IR-Spektrum von synth. Apigenin-7-β-rutinosid (IX)

Die beiden synthetisch dargestellten Apigenin-7-rhamnoglucoside wurden wie üblich acetyliert. Wir erhielten das Apigenin-7-neohesperidosid-octaacetat (XIa) in kräftigen weißen Nadeln vom Schmelzpunkt 220 - 224°. Das Apigenin-7-rutinosidoctaacetat

(IXa) kristallisierte in weißen Nadeln vom Schmelzpunkt 178 - 180°.

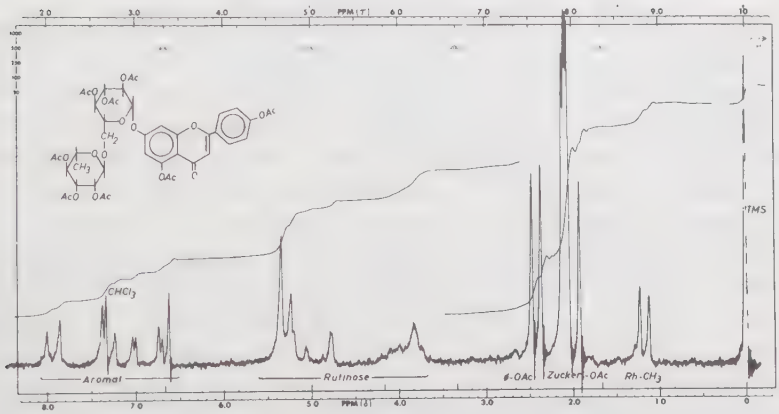


Abb. 28

KMR-Spektrum von Apigenin-7-β-rutinosid-octaacetat (IXa)

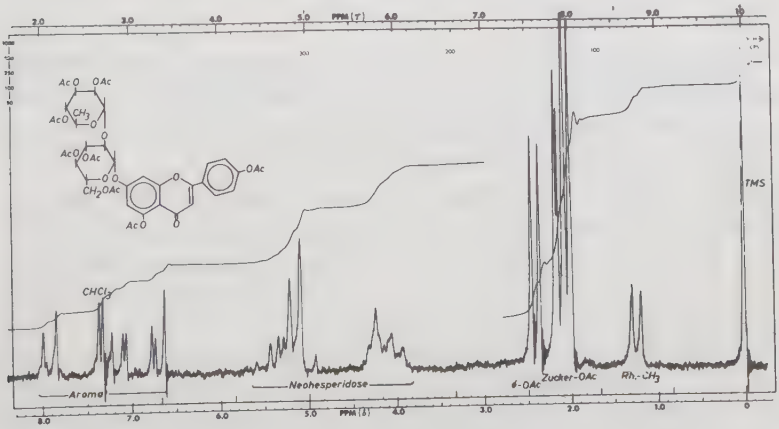


Abb. 29

KMR-Spektrum von Apigenin-7-β-neohesperidosid-octaacetat (XIa)

3. Zur Struktur des Rhoifolins

Rhoifolin ist ein erstmals von HATTORI[125] im Jahre 1951 isoliertes Apigenin-7-rhamnoglucosid aus Rhus succedanea L. In den darauffolgenden Jahren konnte HATTORI Rhoifolin aus Citrusschalen[126], aus den Blättern von Pseudaegle trifoliata MAK. und aus den Blättern von Poncirus trifoliata RAF.[127] isolieren. Auf Grund eines Mischschmelzpunktes mit dem von LORETTE[120] aus Naringin synthetisch dargestellten Apigenin-7-rhamnoglucosid folgerte HATTORI[125], daß Rhoifolin vermutlich mit dem Dehydrierungsprodukt des Naringins identisch sei. Da Naringin, wie später von HOROWITZ[36] bewiesen, ein Derivat der Neohesperidose ist, sollte auch Rhoifolin ein Apigenin-7- n e o - h e s p e r i d o s i d sein. Ein sicherer Beweis stand jedoch noch aus. In der Literatur wird jedoch Rhoifolin vielfach als Apigenin-7- r u t i n o s i d bezeichnet (siehe Chemical Abstracts, KARRER[128], HARBORNE[129], BAILEY[130]). Ebenfalls als Rhoifolin bezeichnet werden Rhamnoglucoside, die in der Zwischenzeit von NAKAOKI aus Boehmeria-Arten[131], von PLOUVIER[132] aus Lupinus, von COUSSIO[133] aus Chorisiaarten und von UASUE[134] aus Blättern von Evodiopanax isoliert wurden.

In nachfolgender Tabelle werden die teilweise sehr unterschiedlichen physikalischen Daten für die als Rhoifolin bezeichneten Substanzen wiedergegeben und mit den von uns synthetisierten Apigenin-7-rhamnoglucosiden verglichen.

Tabelle 4

Physikalische Eigenschaften von als Rhoifolin bezeichneten Apigenin-7-rhamnoglucosiden

Herkunft	Schmp.	Zersetzungspunkt	Mischschmp. mit synthetischem Apigenin-7-neohesperidosid	Opt. Drehung	IR-Spektrum Vergleich m. Apig.-7-neohesp.	DC auf Polyamid Nitromethan-MeOH 65:30 R_f x 100
Rhus succedanea (HATTORI)	200-205°	265°	ohne Depression	$[\alpha]_D^{22}$=-23.5° (MeOH)		
Boehmeria (NAKAOKI)	200°			$[\alpha]_D^{19}$=-160°		
Lupinus (PLOUVIER)	200-205°		ohne Depression		ident.	21
Chorisia (COUSSIO)	202-205°		ohne Depression	$[\alpha]_D^{29}$=-110° (MeOH)	ident.	21
Evodiopanax (UASUE)	265°	265°				
Synthet.Apigen.-7-neohesper.	200-205°		entfällt	$[\alpha]_D^{29}$=-118.7° (MeOH)	entfällt	21
Synthet.Apigen.-7-rutinosid	269-270°	269-270°	185-194° !	$[\alpha]_D^{23}$=-98.2° (Pyridin)	deutlich unterschieden	24

Aus der Tabelle geht hervor, daß Rhoifolin im Sinne von HATTORI [125] kein Apigenin-7-rutinosid sein kann. Unser synthetisches Apigenin-7-neohesperidosid ist identisch mit Rhoifolin aus Lupinus und Chorisia*).

Stark voneinander abweichend sind die in der Literatur angegebenen optischen Drehungen der verschiedenen Rhoifoline. Die von HATTORI[125] angegebene opt. Drehung ist viel niedriger als erwartet, doch ist Rhoifolin in anderen physikalischen Eigenschaften identisch mit Apigenin-7-neohesperidosid: Schmelzpunkt (bzw. Mischschmp.) bei 200 - 205°; Zersetzungspunkt unter Braunfärbung

*) Wir danken den Professoren J. Coussio, Buenos Aires und V. Plouvier, Paris, für die Überlassung von Testsubstanz.

bei 265°; aus abs.Methanol oder aus wässrigem Pyridin kristallisierend; schwer löslich in und nicht kristallisierbar aus verdünntem Methanol (oder verd. Äthanol).

Anders sind die Eigenschaften von Apigenin-7-rutinosid: Der Schmelzpunkt liegt mit 269 - 270° etwa 65° höher als der des Neohesperidosides, die Löslichkeit in Methanol und Äthanol ist erheblich besser, die Verbindung kristallisiert auch aus verdünnten Alkoholen. Ein Mischschmelzpunkt von Apigenin-7-rutinosid mit Rhoifolin (bzw. mit synth. Apigenin-neohesperidosid) ergibt eine D e p r e s s i o n auf 185 - 194°.

Damit ist bewiesen, daß das von HATTORI[125)] erstmals isolierte Apigenin-7-rhamnoglucosid mit Apigenin-7-β-neohesperidosid identisch ist. R h o i f o l i n ist demnach ein A p i g e n i n - 7 - β - [2 - O - α - L - r h a m n o p y r a n o s y l - D - g l u c o p y r a n o s i d].

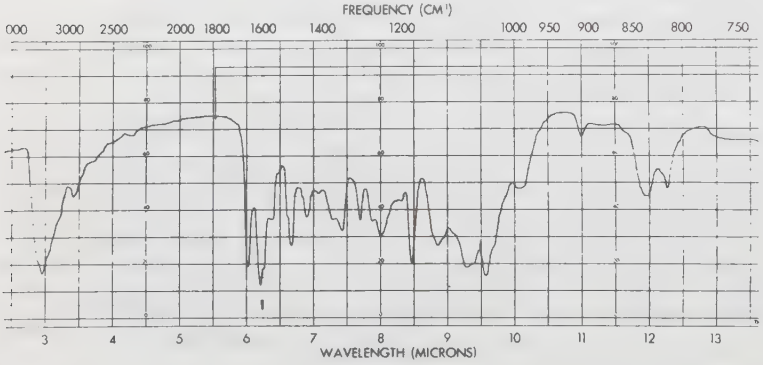


Abb. 30
IR-Spektrum von natürlichem Rhoifolin (XI)

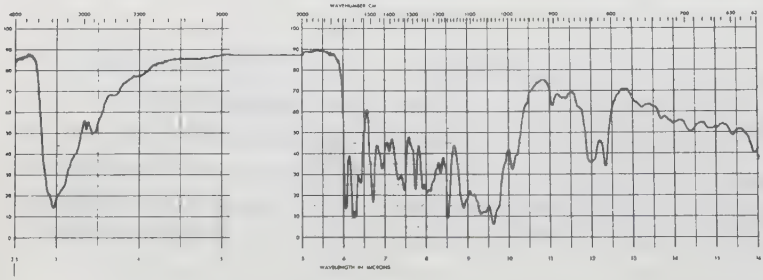
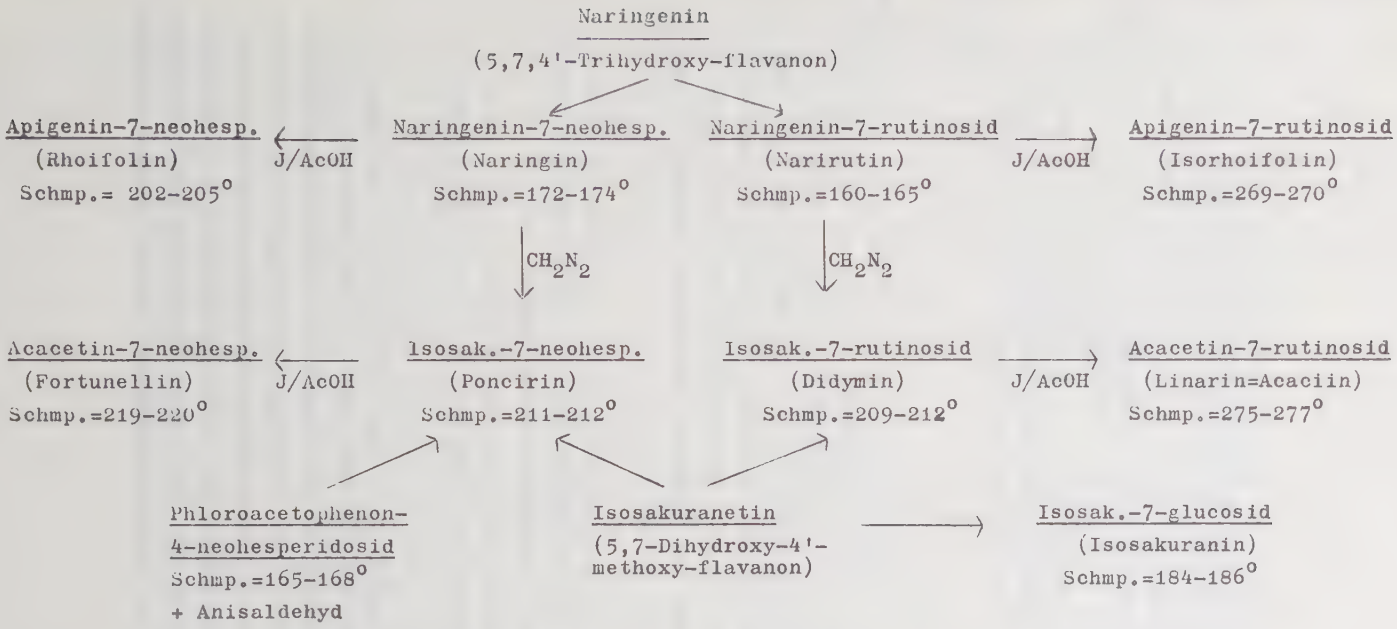


Abb. 31
IR-Spektrum von synthetischem Rhoifolin (XI)



Die in der Tabelle für die Glykoside angegebenen Schmelzpunkte sind die höchsten, die erzielt wurden.

IX. EINFACHE UNTERSCHEIDUNGSMÖGLICHKEITEN VON FLAVANON-RUTINOSIDEN UND -NEOHESPERIDOSIDEN

Flavanon-7-O-rhamnoglucoside wurden in den letzten Jahren aus zahlreichen Pflanzen, insbesondere aus Citrusfrüchten isoliert. Zum Teil enthält ein und dieselbe Pflanze, wie beispielsweise Poncirus trifoliata[107] oder die Grapefruit[77], nebeneinander Rutinoside und Neohesperidoside. Eine einfache Methode zur Unterscheidung isomerer Rhamnoglucoside ist daher wünschenswert.

1. Dünnschichtchromatographie

Die Trennung isomerer Flavanon-rhamnoglucoside mittels Papier- oder Dünnschichtchromatographie gelingt mit herkömmlichen Fließmittelsystemen nur unvollkommen. In den letzten Jahren fanden MIZELLE u. Mitarb.[77)93)] und unabhängig davon auch wir Möglichkeiten zur chromatographischen Trennung von isomeren Rhamnoglucosiden wie beispielsweise Poncirin und Didymin.

Auf Dünnschichtplatten aus mikrokristalliner Cellulose (Avicel SF) trennte MIZELLE[93)] mit dem Fließmittelsystem Methylisobutylketon-Ameisensäure-Wasser (14:3:2) Naringenin- und Isosakuranetin-rhamnoglucoside. Dabei wanderten die Neohesperidoside etwas weiter als die Rutinoside.

Auf Polyamidplatten ergibt sich ein umgekehrtes Bild: Rutinoside zeigen einen höheren R_f-Wert als Neohesperidoside, wenn wasserfreie Fließmittel verwendet werden: Nitromethan-Methanol (MIZELLE[93)]) oder Nitrobenzol-Methanol. Uns gelang bei Verwendung dieser beiden Fließmittel eine sichere Unterscheidung aller uns zur Verfügung stehenden Glykoside. In der Tabelle 6 werden die $R_f \cdot 100$-Werte von Flavanon- und Flavon-rhamnoglucosiden angegeben. Dabei sind die isomeren Glykoside jeweils paarweise aufgeführt.

Tabelle 6

Dünnschichtchromatographie isomerer Flavonoidrhamnoglucoside

Substanz	AVICEL SF Me.isobu. Ket.-Ameisensäure-Wasser (14:3:2)[93]	POLYAMID Nitromethan-Methanol (65:30)	POLYAMID Nitrobenzol-Methanol (65:30)
Didymin	53	78	75
Poncirin	56	73	71
Hesperidin		71	65
Neohesperidin		65	62
Narirutin	32	57	55
Naringin	38	52	51
Linarin		59	68
Fortunellin		55	66
Isorhoifolin		24	42
Rhoifolin		21	42
Rutin		8	

Stehen nicht alle Testsubstanzen zur Verfügung, so ist eine richtige Zuordnung der zu untersuchenden Rhamnoglucoside z.B. dann möglich, wenn Hesperidin und Naringin vorhanden sind. Ein Fleck von nur wenig höherem R_f-Wert als Hesperidin spricht für Poncirin, von nur wenig niedrigerem R_f-Wert als Hesperidin für Neohesperidin. Der Didyminfleck liegt, besonders in Nitrobenzol-Methanol deutlich über Hesperidin. Der Narirutinfleck liegt zwischen Hesperidin und Naringin, doch wesentlich näher bei Naringin.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, werden die Flavanonrhamnoglucoside von den analogen Flavonrhamnoglucosiden besonders gut getrennt. Nach Besprühen mit geeigneten Reagentien (z.B. Natriumborhydrid-Aluminiumchlorid nach KOEPPEN[136]) erscheinen Flavanonglykoside und Flavonglykoside in unterschiedlichen Farben.

2. Geschmackliche Unterschiede von Rutinosiden und Neohesperidosiden

HOROWITZ[137]) zeigte durch Geschmackstest an einer Reihe von Verbindungen auf, daß alle bekannten Flavanonrutinoside ohne Geschmack sind. Flavanonneohesperidoside dagegen haben deutlich bitteren Geschmack. Neohesperidose selbst ist ebenso wie das entsprechende Aglykon geschmacklos. Ein weiteres Geschmacksphaenomen kommt hinzu: Durch Dehydrierung der Flavanonneohesperidoside in die Flavonneohesperidoside geht jeder Geschmack verloren. Auch die natürlich vorkommenden Flavonneohesperidoside sind geschmacklos. Werden die bitteren Verbindungen dagegen zu ihren Chalkonen isomerisiert, so entstehen süße bis bittersüße Verbindungen. Auch Dihydrochalkonderivate haben süßen Geschmack. Alle bisher bekannten vergleichbaren Chalkon-Rutinoside sind geschmacklos.

Der Bitterwert von Flavanonneohesperidosiden ist beachtlich[137]): Wird vergleichsweise für Chinin ein Bitterwert von 100 festgesetzt, so ergibt sich für Phloroacetophenon-4 -neohesperidosid ein Bitterwert von 1; für Neohesperidin ein Bitterwert von 20. Das Chalkon und das Dihydrochalkon des Naringins zeigen dagegen gleichen Süßungsgrad wie Saccharin; das Dihydrochalkon des Neohesperidins ist sogar 20mal süßer.

Die von uns synthetisch dargestellten Verbindungen bestätigen ausnahmslos die Beobachtungen von HOROWITZ[137]). Die Rutinoside Didymin und Narirutin sind geschmacklos; das Poncirinchalkon zeigt schwach süßen Geschmack; Poncirin dagegen schmeckt intensiv bitter.

Eine 1 ⟶ 2 Verknüpfung zwischen Rhamnose und Glucose ist in diesen Glykosiden offensichtlich Voraussetzung für bitteren oder süßen Geschmack. Eine 1 ⟶ 6 Verknüpfung bewirkt dagegen in allen bisher bekannten Fällen Geschmacklosigkeit.

E X P E R I M E N T E L L E R T E I L

I. ALLGEMEINE UNTERSUCHUNGEN

1. Chromatographie

a) Papierchromatographie

Die papierchromatographischen Untersuchungen führten wir mit ungewaschenen Papieren Nr. 2043 b Gl der Fa. Schleicher u. Schüll, Dassel, durch. Es wurde bei Zimmertemperatur in Glaskammern der Größe 50 x 20 x 60 cm absteigend chromatographiert.

b) Dünnschichtchromatographie

Wir verwendeten Spiegelglasplatten der Größe 20 x 12 cm. Als Kammern dienten Weckgläser von 15 cm Durchmesser, bei präparativer Dickschichtchromatographie Gläser im Format 25 x 6 x 25 cm.

Polyamidplatten:
10 g Polyamid der Fa. Macherey, Nagel u. Co., Düren, wurden in 90 ml Methanol fein suspendiert und durch Aufgießen gleichmäßig auf 10 Platten verteilt. Nach dem Trocknen an der Luft waren die Platten gebrauchsfertig.

Kieselgelplatten:
Die Platten wurden durch Aufgießen einer wässrigen Kieselgel-G-Suspension (Fa.Merck) auf Glasplatten hergestellt. Nach 30-minütigem Aktivieren bei 130° waren die Platten gebrauchsfertig. In einigen, besonders angegebenen Fällen wurden DC-Fertigplatten der Fa. Merck verwendet.

c) Gaschromatographie

aa. Modell Packard vom Typ 7500 mit einem β-Strahlen-Argon-Ionisationsdetektor und Honeywell - Kompensationsschreiber vom Typ Elektronic 17. Hersteller: Packard Instrument Company Inc. La Grange Illinois, U.S.A.

bb. Spiralig gebogene Glassäulen von 4 mm innerem Durchmesser und 2 m Länge.

cc. Gaschrom Q, 100 - 120 mesh, Serva Feinchemikalien, Heidelberg; Chromosorb WS, 45 - 60 mesh, Th.Schuchardt G.m.b.H., München, als Trägermaterial.

dd. Spezialargon der Firma Linde A.G., München, als Trägergas.

ee. Apiezon L (Sliconfett), Th.Schuchardt G.m.b.H., München; QF - 1, Fa. Applied Science Lab.Inc. (Lager: Serva Feinchemikalien, Heidelberg)

Neopentylglykolsuccinat und
Polyphenyläther, beide Fa. Wilkens Instr. u.Research Inc., Darmstadt, als flüssige Phasen.

ff. Empfindlichkeit des Detektor: 10^{-7}A
des Schreibers: 3×10^{-8}A
Papiervorschub: 5 Min./inch.

d) Säulenchromatographie

Kieselgelsäulen:
Verwendet wurde Kieselgel Merck (0.05 - 0.2 mm), das mit dem jeweiligen Elutionsmittel in die Säule eingeschlämmt wurde. Die Abtropfgeschwindigkeit betrug 15 - 20 Tropfen in der Minute bei 4 cm Säulendurchmesser.

Polyamidsäulen:
Das Adsorbens bestand aus Polyamid*), dessen lösliche Bestandteile durch mehrstündiges Rühren in Wasser und anschließend Methanol entfernt wurden. Nach Absaugen schlämmten wir das Polyamid mit dem jeweiligen Elutionsmittel in die Säule ein und wuschen damit über Nacht bei normaler Abtropfgeschwindigkeit. Sie betrug bei 6 cm Säulendurchmesser 15 - 20 Tropfen in der Minute.

e) Sprühreagentien

Die Chromatogramme wurden nach dem Trocknen unbesprüht und besprüht, meist unter UV-Licht, betrachtet.

*) Herstellung nach H.P.HÖRHAMMER, Dissertation München 1966.

Zucker und Methylzucker:
Anilinhydrogenphthalatlösung; Erhitzen auf 120°. Konzentrierte Schwefelsäure; Erhitzen auf 160°.

Flavonoide:
Natriumborhydrid/Aluminiumchloridlösung nach KOEPPEN[136]; Erhitzen auf 105° (Papier) oder 150° (Silicagelplatte) für Flavanone.

Aluminiumchloridlösung; Erwärmen und Betrachten im UV.
Konzentrierte Schwefelsäure; Erhitzen auf 160°.
Basische Bleiacetatlösung.

2. Physikalische Untersuchungen

a) Mikroanalysen
Die Bestimmungen wurden im Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München durchgeführt.

b) Schmelzpunkte
Wir trockneten die Substanzen bei den Schmelzpunkten angepaßten Temperaturen in der Trockenpistole über Diphosphorpentoxid und bestimmten den Schmelzintervall auf der Koflerheizbank der Fa. Reichert, Wien. Die angegebenen Werte sind unkorrigiert.

c) UV-Spektren
Die UV-Absorptionsspektren wurden mit einem Zeiss-Opton-Spektralphotometer PM Q 2 in Methanol p.a. aufgenommen. Die Einwaagen betrugen 1 - 2 mg auf 100 ml Lösung. Die Schichtdicke war 10 mm.

d) IR-Spektren
Die Spektren wurden im Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München mit dem Beckmann-Spektrophotometer IR 8 in KBr gemessen. Konzentration 1 - 1.5 mg/150 mg KBr.

e) KMR-Spektren
Die Kernresonanzspektren wurden am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München mit einem

VARIAN A-60 A Kernresonanzspektrometer aufgenommen. Als Lösungsmittel für etwa 40 - 60 mg Substanz dienten 0.5 ml Deuterochloroform oder Dimethylsulfoxid.

f) Optische Drehungen
Die Drehungen wurden im Lichtelektrischen Polarimeter der Fa. Zeiss (LEP A2) gemessen.

g) Wassergehaltsbestimmungen
Etwa 100 mg lufttrockene Substanz wurde bei möglichst hoher Temperatur im Hochvakuum getrocknet. Trotz scharfer Trocknung nicht abgegebenes Kristallwasser wurde nach Karl Fischer titrimetrisch bestimmt. Einwaage etwa 60 mg.

Für die Ausführung der Mikroanalysen, der IR- und KMR-Spektren, der Optischen Drehungen und der chemischen Wassergehaltsbestimmungen danken wir herzlich Herrn O. Seligmann, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München.

II. PERMETHYLIERUNG VON GLYKOSIDEN UND HYDROLYSE ZU TRI- UND TETRAMETHYLHEXOSEN

1. Permethylierung von Disacchariden

a) Methyl-hepta-O-methyl-4-O-β-D-glucopyranosyl-D-glucopyranosid (Methyl-hepta-O-methyl-cellobiosid = Octamethylcellobiose)

3 g Cellobioseoctaacetat wurden in 20 ml destilliertem Dimethylformamid (DMF) gelöst und unter Eiskühlung mit 17 g Bariumoxid, fein gepulvert und 17 g Bariumhydroxid versetzt. Unter Rühren wurden bei schwachem Stickstoffstrom 35 ml Dimethylsulfat langsam zugetropft. Wir methylierten unter Stickstoff etwa 4 Stdn. bei 0°, dann 14 Stdn. bei Zimmertemperatur. Anschließend rührten wir nach Zugabe von 30 ml Ammoniak zur Zersetzung überschüssigen Dimethylsulfats noch 30 Min. weiter. Das Produkt wurde, wie oben beschrieben, mit Chloroform aufgenommen und nach Reinigung zu einem hellgelben Sirup eingeengt. Ausbeute etwa 2 g. Nadeln aus Äther-Hexan vom Schmp. 80 - 82°; Lit.[49]: Schmp. 76 - 78°.

Chromatographie:
Kieselgelplatte Merck, Benzol-Aceton (1:1)
β-Methyl-hepta-O-methyl-cellobiosid R_f 0.75
α-Methyl-hepta-O-methyl-cellobiosid R_f 0.67
Schwarzfärbung mit konz. H_2SO_4 bei 130°

Gaschromatographie:
2 m Säule Neopentylglykol-succinat, 10% auf Gaschrom Q
Temperatur: 218°: Einlaß 250°, Detektor 220°, Auslaß 230°
Papiervorschub: 5 Min./inch.
Gasdurchfluß: 79 ml Argon/Min.

Retentionszeiten für

Octamethylcellobiose	(α + β Glykosid)	20.2 u. 24.7 Min.
Octamethylsophorose	(α Glykosid)	26.3 Min.
Octamethylmelibiose	(α + β Glykosid)	24.5 u. 32.9 Min.
Octamethylmaltose	(α + β Glykosid)	25.5 u. 32.9 Min.

b) Methyl-hepta-O-methyl-4-O-α-D-glucopyranosyl-D-glucopyranosid (Methyl-hepta-O-methyl-maltosid = Octamethylmaltose)

3 g Maltose wurden in 20 ml frisch destilliertem Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, mit 20 ml dest. DMF, 5 g Bariumhydroxid und 10 g Bariumoxid versetzt. Unter Rühren gaben wir bei schwachem Stickstoffstrom im Verlauf von 6 Stdn. 14 ml Dimethylsulfat dazu. Nach 65-stündiger Methylierungsdauer gaben wir 25 ml Ammoniak hinzu, rührten 30 Minuten und verdünnten anschließend mit 150 ml Chloroform. Wir schüttelten das Methylierungsprodukt damit aus, wiederholten den Vorgang mit 100 ml Chloroform und schüttelten die vereinigten Chloroformphasen dreimal mit je 20 ml Wasser aus, wobei dem 2. Waschwasser 2 Tropfen Essigsäure zugesetzt wurden. Nach Trocknen der Chloroformlösung über Natriumsulfat und Abdestillieren erhielten wir einen klaren, schwach gelblich gefärbten Sirup.
Ausbeute etwa 3 g (76% der Theorie).

Chromatographie:
Kieselgelplatte Merck, Benzol-Aceton (1:1)
β-Methyl-hepta-O-methyl-maltosid R_f 0.76
α-Methyl-hepta-O-methyl-maltosid R_f 0.71
Schwarzfärbung mit konz. H_2SO_4 bei 130°

Gaschromatographie: siehe Seite 88

c) α-Methyl-hepta-O-methyl-2-O-β-D-glucopyranosyl-D-glucopyranosid (Methyl-hepta-O-methyl-sophorosid = Octamethylsophorose)

0.900 g Methyl-2-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-glucopyranosyl)-3,4,6-tri-O-acetyl-α-D-glucopyranosid, dargestellt in unserem Arbeitskreis von R.Dirscherl*) wurden in 4 ml DMSO und 2 ml DMF gelöst. Unter Eiskühlung gaben wir 4.8 g Bariumoxid, gepulvert, und 2.4 g Bariumhydroxid sowie im Laufe von 1 Stde. 10 ml frisch destilliertes Dimethylsulfat dazu. Wir methylierten unter Stickstoff bei heftigem Rühren 4 Stdn. bei 0°, dann 20 Stdn. bei Raumtemperatur. Mit 6 ml konz. Ammoniak wurde dann 20 Min. zur Zersetzung von freiem Dimethylsulfat weitergerührt. Aus der neutralisierten Lösung erhielten wir nach üblicher Aufarbeitung

*) Dissertation in Vorbereitung.

0.641 g eines hellgelben, geruchfreien Sirups, aus dem in Petroläther lange weißliche Nadeln kristallisierten. Schmp. 78 - 80°. Ausbeute: 84% der Theorie.

Chromatographie:
Kieselgelplatte Merk, Benzol-Aceton (1:1)
α-Methyl-hepta-O-methyl-sophorosid R_f 0.78
Schwarzfärbung mit konz. H_2SO_4 bei 130°.

Gaschromatographie: siehe S. 88

d) Methyl-hepta-O-methyl-6-O-α-D-galactopyranosyl-D-glucopyranosid (Methyl-hepta-O-methyl-melibiosid = Octamethylmelibiose)

1.24 g Melibiosemonohydrat wurden in 4 ml dest. DMSO und 20 ml DMF durch Schütteln gelöst. Unter Stickstoff wurden bei 0° im Laufe von 10 Minuten 6 g gepulvertes Bariumoxid, 0.240 g Bariumhydroxid und 0.5 g frisch aktiviertes Drierite zugegeben. Wir versetzten die Suspension mit 6 ml Methyljodid und schüttelten in einer Stickstoffatmosphäre 10 Stdn. bei Zimmertemperatur. Wir verdünnten anschließend mit 100 ml Dichlormethan, zentrifugierten vom Rückstand ab, wuschen 4mal mit 10 ml Wasser und engten die organischen Phasen nach Trocknen über Natriumsulfat im Vakuum zum Sirup ein. Dieser wurde in möglichst wenig heißem Heptan gelöst. Wir erhielten darauf 1.12 g Octamethylmelibiose in langen, balkenförmig dicken Nadeln. Ausbeute: 68.5% der Theorie. Schmp.: 99 - 102°. Lit.[48]: Schmp. 101 - 103°.

Chromatographie:
Kieselgelplatte Merck, Benzol-Aceton (1:1)
β-Methyl-hepta-O-methyl-melibiosid R_f 0.72
α-Methyl-hepta-O-methyl-melibiosid R_f 0.65
Schwarzfärbung mit konz. H_2SO_4 bei 130°

Gaschromatographie: siehe Seite 88.

2. Gewinnung und Analyse der Methylhexosen

a) Hydrolyse der Permethyldisaccharide

100 mg Methyl-hepta-O-methyl-disaccharid wurden mit 4 ml 0.5 n Schwefelsäure versetzt und am Rückflußkühler gekocht. Nach etwa 10 Min. war vollständige Auflösung der Methylverbindungen eingetreten. Nach 30-minütiger Hydrolyse ließen wir abkühlen und neutralisierten die Lösung mit Bariumhydroxid. Das gebildete Bariumsulfat wurde abzentrifugiert, die überstehende Lösung am Rotationsverdampfer abdestilliert, der Rückstand mit absolutem Äthanol aufgenommen, filtriert, eingeengt und endlich in Chloroform p.a. gelöst. Die Chloroformlösungen wurden chromatographisch untersucht. Aus Methyl-hepta-O-methyl-cellobiosid und aus Methyl-hepta-O-methyl-maltosid entstanden 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucopyranose und 2,3,6-Tri-O-methyl-D-glucopyranose.

Aus Methyl-hepta-O-methyl-sophorosid entstanden 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucopyranose und 3,4,6-Tri-O-methyl-D-glucopyranose.

Aus Methyl-hepta-O-methyl-melibiosid entstanden 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-galactopyranose und 2,3,4-Tri-O-methyl-D-glucopyranose.

Analyse der Methylzucker

b) Papierchromatographie

Butanol-Wasser-Tetrachlorkohlenstoff (4:4:3) (Unterphase)

2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose	R_f 0.75
2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-galactose	R_f 0.56
2,3,4-Tri-O-methyl-D-glucose	R_f 0.53
2,3,6-Tri-O-methyl-D-glucose	R_f 0.42
2,4,6-Tri-O-methyl-D-glucose*)	R_f 0.36
3,4,6-Tri-O-methyl-D-glucose	R_f 0.45
2,3,4-Tri-O-methyl-L-rhamnose*)	R_f 0.78

Braunfärbung mit Anilinhydrogenphthalat bei 110°.

*) Als Vergleichssubstanzen zusätzlich aufgetragen.

c) Dünnschichtchromatographie

Tabelle 7

R_f · 100-Werte von Methylhexosen

Substanz	A	B	C
2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose	58	67	55
2,3,4-Tri-O-methyl-D-glucose	37	52	35
2,3,6-Tri-O-methyl-D-glucose	32	43	37
2,4,6-Tri-O-methyl-D-glucose*)	27	41	31
3,4,6-Tri-O-methyl-D-glucose	30	48	34
2,3,4-Tri-O-methyl-L-rhamnose*)	68	80	58
2,4-Di-O-methyl-D-glucose*)	14	-	-
2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-galactose	46	-	-

Kieselgelplatte, nicht aktiviert; A = Benzol-Aceton (1:1)
B = Diisopropyläther-Methanol (5:1)
C = Benzol-Äthanol (8:2)

Braunfärbung mit Anilinhydrogenphthalat bei 110°
*) als Vergleichssubstanzen zusätzlich aufgetragen

d) Gaschromatographie

2 m Säule Polyphenyläther, 15% auf Gaschrom Q
Temperatur: Säule 170°, Einlaß 230°, Detektor 212°, Auslaß 230°
Gasdurchfluß: 77 ml (Argon)

Retentionszeiten für:

2,3,4,6-Tri-O-methyl-L-rhamnose*)	22.5 Min.
2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose	31.0 Min.
2,3,4-Tri-O-methyl-D-glucose	43.0 Min. (z)
2,3,6-Tri-O-methyl-D-glucose	46.4 Min.
3,4,6-Tri-O-methyl-D-glucose	45.2 Min.
2,4,6-Tri-O-methyl-D-glucose*)	59.0 Min.

*) als Vergleichssubstanzen aufgetragen
(z) = teilweise in schwächer adsorbierte Derivate zersetzt

e) Isolierung der Methylhexosen

2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucopyranose und 2,3,6-Tri-O-methyl-D-glucopyranose.

Das Hydrolysat aus 1.5 g Octamethylmaltose wurde auf eine mit Kieselsäure gefüllte Säule von 6 cm Durchmesser und 40 cm Höhe gegeben. Als Leitsubstanz wurde eine Sudan-III-Lösung zusätzlich aufgetragen. Wir eluierten mit 500 ml 10% äthanolischem Benzol, dann mit 20% äthan.Benzol. Die auf die mit Sudan III gefärbte Fraktion folgenden Eluate wurden auf Anwesenheit von Tetramethylglucose geprüft. Nach insgesamt 750 ml 20% äthan. Benzoleluat enthielten die folgenden Fraktionen zuerst reine 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucopyranose, dann eine Mischung aus 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucopyranose und 2,3,6-Tri-O-methyl-D-glucopyranose und zuletzt reine 2,3,6-Tri-O-methyl-D-glucopyranose. Nach Abdestillieren der Lösungsmittel erhielten wir etwa 400 mg reine Tetramethylglucose und 320 mg reine Trimethylglucose als farblose sirupöse Flüssigkeiten.

2,3,4-Tri-O-methyl-D-glucopyranose und 3,4,6-Tri-O-methyl-D-glucopyranose.

Das Hydrolysat von 100 mg Octamethylmelibiose bzw. Octamethylsophorose wurde auf jeweils drei 2 mm dicken Kieselgel-H-Platten (20 x 20) aufgetragen. Der Kieselgelsuspension war dabei der Fluorescenzindikator Pyranin (3-Hydroxy-pyren-5,8,10-trisulfonsaures Natrium) zu 0.03‰ zugefügt. Wir chromatographierten mit Benzol-Aceton (1:1). Die an der Luft getrockneten Platten wurden unter dem UV-Licht betrachtet. Die Methylzucker konnten als bläuliche Streifen auf gelbgrünem Untergrund von der Platte geschabt werden. Die die Trimethylhexosen enthaltenden Kieselgelfraktionen wurden mehrmals in Chloroform auf dem Magnetrührer suspendiert. Die Lösungen wurden filtriert und im Vakuum eingedampft. Wir erhielten 2,3,4-Tri-O-methyl-D-glucopyranose und 3,4,6-Tri-O-methyl-D-glucopyranose jeweils als farblosen Sirup.

3. Permethylierung und nachfolgende Hydrolyse von Modellglykosiden

a) Permethylierung von 1,2-Dihydroxy-anthrachinon-2-β-[6-O-β-D-xylosyl-D-glucosid] (2-Alizarin-β-primverosid = Ruberythrinsäure)

100 mg Ruberythrinsäure wurden in 1.5 ml DMSO und 1.5 ml DMF, beide frisch destilliert, gelöst und unter Kühlung mit 0.5 g Bariumhydroxid, 1.0 g Bariumoxid und 1.2 ml destilliertem Dimethylsulfat im Stickstoffstrom versetzt. Wir methylierten 48 Stdn. unter kräftigem Rühren. Dabei wurde die anfangs tiefrote Mischung allmählich orangerot. Nach Zugabe von erneut 1 g Bariumoxid und 1 ml Dimethylsulfat methylierten wir weitere 24 Stdn. Die nun hellgelbe Suspension verdünnten wir mit 50 ml Chloroform. Dann wurde nacheinander mit 5 ml Wasser, 5 ml 15% Natriumthiosulfatlösung, 5 ml 5% Kalilauge (wobei keine Rotfärbung auftrat) und schließlich mit Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen. Wir erhielten nach Abdestillieren des Chloroform und Entfernen der höhersiedenden Lösungsmittel durch azeotrope Destillation mit Toluol im Vakuum 73.35 mg Methylierungsprodukt. 45 mg Permethylruberythrinsäure vom Schmp. 233 - 234° aus Äthanol. Lit.[52]: Schmp. = 170 - 180°.

Chromatographie:
Kieselgelplatte, Benzol-Äthanol (83:17)
Permethylruberythrinsäure R_f 0.75
Rotfärbung mit konz. H_2SO_4 bei 110°

b) Permethylierung von 3,5,7,3',4'-Pentahydroxy-flavon-3-β-[6-O-α-L-rhamno-pyranosyl-D-glucopyranosid] (Rutin) nach einer modifizierten KUHN-Methode

150 mg Rutin wurden nach 12-stündigem Trocknen über Diphosphorpentoxid bei 110°/12 Torr in 5 ml DMF "für Spektroskopie" gelöst. Unter ständigem Rühren auf dem Magnetrührer im Eisbad gaben wir unter Stickstoff 40 mg Bariumhydroxid und 1 g peroxidfreies, fein gepulvertes Bariumoxid, sowie tropfenweise 3 ml Methyljodid dazu. Nach Zugabe von 1 g Drierite schüttelten wir das Gefäß in einer Stick-

stoffatmosphäre und unter Ausschluß von Feuchtigkeit 18 Stdn.. Nach oben beschriebener Aufarbeitung erhielten wir ein weitgehend durchmethyliertes Produkt, das chromatographisch aus 4 dicht beisammenliegenden Flecken im R_f-Bereich 0.4 - 0.5 bestand. Wir lösten den Sirup in 5 ml DMF für Spektroskopie und gaben 20 mg Bariumhydroxid, 500 mg Bariumoxid, 1.5 ml Methyljodid und 500 mg Drierite dazu. Wir verfuhren dabei, wie vorstehend beschrieben und erhielten nach 18-stündigem Methylieren bei 25° ein halbkristallines, gelblichweißes Permethylrutin. Ausbeute: 120 mg (71% der Theorie).

IR-Spektrum siehe Abb. 32.

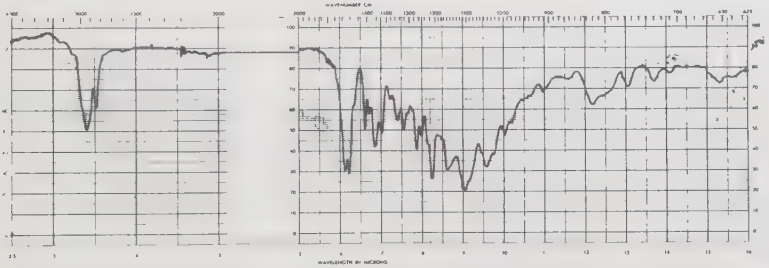


Abb. 32

IR-Spektrum von Permethylrutin

Chromatographie:
Kieselgelplatte, Benzol-Äthanol (85:15)

Ein Fleck bei R_f 0.48 (blau unter dem UV bei 360 mμ)

Hydrolyse des Permethylrutins und Identifizierung der Methylzucker

50 mg Permethylrutin wurden in einer Ampulle bei 75° mit 1 ml einer Mischung aus Methanol und 60% Perchlorsäure im Verhältnis 10:1 4 Stdn. erhitzt. Nach Abkühlen und Öffnen der Ampulle wurde das Methanolysat mit 3 ml Wasser versetzt, vom ausgefallenen Tetramethylquercetin abfiltriert, vom Methanol befreit

und noch 90 Min. bei 100° hydrolysiert. Nach Neutralisation mit Dowex 1x8 wurde eingeengt und von geringen Resten eines braunen Niederschlags abfiltriert. Die überstehende farblose Lösung wurde im Vakuum durch azeotrope Destillation mit Äthanol und Benzol vom Wasser befreit und in Chloroform p.a. gelöst. Diese Lösung wurde papier-, dünnschicht- und gaschromatographisch untersucht. Stets waren 2,3,4-Tri-O-methyl-D-glucose und 2,3,4-Tri-O-methyl-L-rhamnose als einzige Flecken nachweisbar.

Methanolyse von Permethylrutin mit 5% methanolischer Salzsäure während 5 Stdn. bei 70° und anschließende Hydrolyse führte zu gleichen Ergebnissen.

Papierchromatographie:
Benzol-Äthanol-Wasser-Ammonik 25% (200:47:14:1) (Oberphase)

2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose	R_f 0.60	(als Testvergl.)
2,3,4-Tri-O-methyl-D-glucose	R_f 0.30	
3,4,6-Tri-O-methyl-D-glucose	R_f 0.27	
2,3,4-Tri-O-methyl-L-rhamnose	R_f 0.61	

Dünnschichtchromatographie:
Kieselgelplatte, Benzol-Äthanol (8:2)

2,3,4-Tri-O-methyl-L-rhamnose	R_f 0.58
2,3,4-Tri-O-methyl-D-glucose	R_f 0.37
3,4,6-Tri-O-methyl-D-glucose	R_f 0.35

Braunfärbung mit Anilinhydrogenphthalat bei 110°

Gaschromatographie:
2 m Säule Polyphenyläther, 15% auf Gaschrom Q; 170°
Gasdurchfluß 78 ml/Min.
Retentionszeit für

2,3,4-Tri-O-methyl-L-rhamnose	22.5 Min.	
2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose	31.6 Min.	(als Vergl. substanz)
2,3,4-Tri-O-methyl-D-glucose	43.1 Min.	
3,4,6-Tri-O-methyl-D-glucose	45.4 Min.	

c) Permethylierung von 5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7-β-[6-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid] (Hesperidin) und 5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7-β-[2-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid] (Neohesperidin)

150 mg Hesperetin-7-rhamno-glucosid wurden in vorstehend beschriebener Weise 21 Stdn. bei Raumtemperatur und anschließend 3 Stdn. bei 40° methyliert. Nach üblicher Aufarbeitung erhielten wir chromatographisch aus mehreren Flecken bestehende Produkte. In Analogie zur oben beschriebenen Nachmethylierung von partiell methyliertem Rutin wurden die erhaltenen Produkte erneut 29 Stdn. lang alkyliert. Wir erhielten nach Aufarbeitung in beiden Fällen ein Permethylprodukt, das chromatographisch aus zwei dicht beisammenliegenden Flecken von gelbgrüner (R_f 0.50) und blauer (R_f 0.48) Farbe bestand (UV-Licht). Fließmittel: Benzol-Äthanol (8:2), Kieselgel G-Platte.

Hydrolyse von Permethyl-Hesperidin und -Neohesperidin

50 mg Methylierungsprodukt wurden bei 70° mit 5% methanolischer Salzsäure 3 Stdn. erhitzt. Das Methanolysat wurde mit 3 ml Wasser versetzt, vom Methanol befreit, filtriert und noch 90 Min. bei 100° hydrolysiert. Nach Aufarbeitung, wie vorstehend bei Hydrolyse von Permethylrutin beschrieben, wurden die Lösungen dünnschicht- und gaschromatographisch untersucht. Es waren stets 2,3,4-Tri-O-methyl-L-rhamnose und weiterhin beim Hesperidinderivat 2,3,4-Tri-O-methyl-D-glucose, beim Neohesperidinderivat 3,4,6-Tri-O-methyl-D-glucose, jedoch in keinem Fall eine Spur einer Dimethylhexose nachweisbar.

Chromatographie: siehe Seite 96.

d) Permethylierung von 5,7,4'-Trihydroxy-flavanon-7-β-[2-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid] (Naringin)

165 mg Naringin, über Diphosphorpentoxid getrocknet, wurden, wie oben beschrieben, mit 4 ml DMF, 41 mg Bariumhydroxid, 1 g Bariumoxid und 3 ml Methyljodid unter Zusatz von Drierite methyliert. Nach 14-stündigem Schütteln bei Raumtemperatur wurde wie üblich aufgearbeitet. Wir erhielten ein chromatographisch

praktisch reines Permethylderivat, das als gelblicher Sirup erhalten wurde. Ausbeute: etwa 175 mg.

60 mg Naringinoctaacetat wurden in 2.5 ml DMF für Spektrokopie gelöst, mit 40 mg Bariumhydroxid, 1 g Bariumoxid und 1.2 ml Methyljodid versetzt und 12 Stdn. bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach üblicher Aufarbeitung erhielten wir ein chromatographisch völlig reines Permethylderivat. Ausbeute etwa 40 mg, entsprechend knapp 90% der Theorie.

Hydrolyse des Permethylnaringinchalkons

50 mg Permethylnaringinchalkon wurden bei etwa 70° im Trockenschrank in einer Ampulle mit 1 ml 5% methanolischer Salzsäure 3 Stdn. erhitzt und nach Verdünnen mit 3 ml Wasser und Vertreiben des Methanols filtriert. Bei 100° wurde anschließend 90 Min. hydrolysiert. Nach oben beschriebener Aufarbeitung wurde die Lösung dünnschicht- und gaschromatographisch untersucht. Es konnten 2,3,4-Tri-O-methyl-L-rhamnose und 3,4,6-Tri-O-methyl-D-glucose, jedoch keine Di- oder Tetra-methylhexose nachgewiesen werden.

Chromatographie des Permethylnaringinchalkons:
Kieselgelplatte, Benzol-Äthanol (8:2)
R_f-Wert: 0.56; Rotfärbung mit konz. H_2SO_4

Chromatographie der Methylhexosen: siehe Seite 96.

III. ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLÄRUNG EINES ISOSAKURANETIN-RHAMNOGLUCOSIDES (DIDYMIN) AUS MONARDA DIDYMA L.

1. Isolierung von Didymin

1.8 kg getrocknetes Blattmaterial von Monarda didyma L. wurden zerkleinert und zunächst erschöpfend mit Chloroform, anschließend mit Methanol im Soxhlet bis zur Farblosigkeit extrahiert. Der Methanolextrakt wurde auf etwa 300 ml eingeengt und 2 Tage im Eisschrank stehengelassen. Es fiel ein grauer Niederschlag aus. Dieser wurde abgesaugt, in wässrigem Methanol suspendiert, die Suspension auf dem Wasserbad erwärmt und erneut filtriert. Der Niederschlag wurde verworfen. Die glykosidhaltige Lösung wurde eingeengt und mit dem obigen Methanolextrakt vereinigt. Anschließend wurde dieser mit 100 ml Aceton versetzt. Dabei schied sich ein dunkelbrauner, sehr gut wasserlöslicher Sirup ab. Nach Abdekantieren der überstehenden Lösung wurde er in Wasser gelöst und mit Äthylacetat mehrmals ausgeschüttelt. Die wässrige, mehrere Zucker enthaltende Lösung wurde verworfen, die organische Phase getrocknet, eingeengt und mit der obigen, abdekantierten Lösung vereinigt. Man verdünnte mit Wasser auf das Doppelte und zog im Vakuum das Aceton und Methanol ab. Der bei $+5^{o}$ ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert und verworfen. Die wässrige Lösung wurde in Anteilen mit insgesamt 6 l Äthylacetat ausgeschüttelt. Nach Trocknen und Einengen der Lösung wurde der sirupöse braune Rückstand in Äthanol gelöst. Nach etwa 10-tägigem Stehenlassen im Eisschrank erhielten wir bräunliche Kristalle. Da die Mutterlauge laut Papierchromatogramm noch stark glykosidhaltig war, engten wir sie ein, verrieben sie mit etwa 10 g Polyamid und gaben das so erhaltene Pulver auf Polyamidsäulen von 6 cm Durchmesser und 50 cm Füllhöhe. Es wurde mit Wasser eluiert. Aus den ersten gefärbten Fraktionen erhielten wir das Didymin (I) in feinen weißen Nadeln, die nach Umkristallisieren aus Methanol-Wasser und anschließend aus Me-

thanol einen Schmelzpunkt von 209 - 212° aufwiesen. Die Glykosidausbeute betrug 0.67 g (0.037%). Lit.[78]: Ausbeute 0.02%. Lit.[98]: Schmp. 211 - 213°. Das im Hochvakuum bei 120° getrocknete Glykosid enthält 1 Mol Kristallwasser, bestimmt nach Karl Fischer (ber. 3.03%, gef. 3.4%).

$C_{28}H_{34}O_{14}\cdot H_2O$ (612.6) ber. C 54.89 H 5.93 1 OCH_3 5.08
gef. C 55.02 H 6.04 OCH_3 5.47

$[\alpha]_D^{26} = -105.3°$ (c = 1.44 in Methanol) Lit.[78]: $[\alpha]_D^{20} = 0°$

$[\alpha]_D^{26} = -77.4°$ (c = 0.59 in DMF)

$[\alpha]_D^{26} = -72.5°$ (c = 1.43 in DMSO)

$[\alpha]_D^{26} = -84.7°$ (c = 1.49 in Pyridin)

UV (Methanol p.a.) λ_{max} (log ε) 287 (4.16); Inflex. 332 mμ (3.45)

IR-Spektrum auf Seite 51.

Didymin-heptatrimethylsilyläther (Ia)
KMR-Spektrum in CCl_4 (TMS als int.Standard):
Signale bei δ = 4.9 ppm (Glucose-H-1), 4.2 - 4.4 ppm (Dubl., Rhamnose-H-1);
δ = 0.8 - 1.0 ppm (breit, Rhamnose-CH_3).

Chromatographie:
Kieselgelplatte, Äthylacetat-Methanol-Wasser (80:14:10)
Didymin R_f 0.47
Rotfärbung mit Natriumborhydrid /Aluminiumchlorid bei 150°

2. Hydrolysen von Didymin

a) Partielle Hydrolysen mit 10% Essigsäure

39 mg Didymin wurden mit 15 ml 10% Essigsäure 10 Stdn. am Rückflußkühler gekocht. Nach Neutralisation mit Natriumbicarbonatlösung engten wir auf 1 ml ein und chromatographierten die Lösung auf 2 Bögen Schleicher u. Schüll Papier 2043 b mit 2% Essigsäure. Die das Monoglucosid enthaltenden Zonen

wurden ausgeschnitten und mit 70% Methanol über Nacht eluiert. Das Eluat enthielt chromatographisch reines Isosakuranetin-7-β-D-glucosid, Isosakuranin (III). Es konnte auf Grund zu geringer Ausbeute nicht zur Kristallisation gebracht werden.

31 mg Didymin wurden mit 5 ml 10% Essigsäure 14 Stdn. am Rückflußkühler gekocht. Die Lösung wurde direkt auf Chromatogramme aufgetragen (Tab. 8).

Tabelle 8

Chromatographie der Hydrolyseprodukte des Didymins ($R_f \cdot 100$-Werte)

Substanz	A	B	C	D
Rutinose	21	18	17	45
Glucose	28	24	27	54
Rhamnose	46	50	44	65
Didymin	64	57	55	-
Isosakuranin	77	70	73	-
Isosakuranetin	90	86	91	-

A = Papierchromatogramm; Butanol-Eisessig-Wasser (6:1:2)
B = Papierchromatogramm; Butanol-Benzol-Pyridin-Wasser (1:5:3:5)
C = Kieselgelplatte; Methyläthylketon-Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (3:5:1:1)
D = Kieselgelplatte; Butanol-Isopropanol-Wasser (5:3:1)

Sprühreagentien: 5% äthanol.Aluminiumchloridlösung, Erwärmen auf 80°; anschließend Anilinhydrogenphthalatlösung, Erhitzen auf 110°. Betrachten des Chromatogramms im UV-Licht.

b) Hydrolyse nach FOX, SAVAGE u. WENDER[79]

100 mg Didymin wurden in 20 ml Cyclohexanol gelöst und am Rückfluß mit 2.5 ml 99% Ameisensäure 9 Stdn. erhitzt. Chromatographisch war neben unverändertem Glykosid relativ viel Isosakuranin und wenig Aglykon nachweisbar. Wir chromatographierten die Lösung auf 2 Bögen Schleicher-Schüll-Papier 2043 b mit 2% Essig-

säure absteigend. Nach 20 Minuten wurden die Papiere herausgenommen, getrocknet und erneut etwa 4 Stdn. chromatographiert. Unter dem UV-Licht wurden die Streifen, die das Isosakuranin enthielten, herausgeschnitten und über Nacht mit 70% Methanol eluiert. Das Eluat enthielt chromatographisch reines Isosakuranin. Wir entfernten das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer und lösten den Rückstand in Aceton p.a.. Wir filtrierten in ein Kölbchen und verdünnten das Filtrat etwas mit Wasser. Nach einigen Tagen kristallisierte das Isosakuranin (III) in weißen Nadeln aus. Ausbeute: 7.3 mg. Nach 2maligem Umkristallisieren aus wässrigem Aceton stieg der Schmelzpunkt von 155 - 160° auf 183 - 186° (Lit.[80]: Schmp. 184 - 186°).
IR-Spektrum auf Seite 49.

c) Quantitative Hydrolyse und Darstellung der Zuckerosazone

aa. 59.4 mg Didymin wurden mit 10 ml 1.5 n HCl etwa 100 Minuten unter Rückfluß gekocht. Nach dem Erkalten kristallisiert das Aglykon in langen Nadeln aus. Es wurde auf einer bei 105° konstant gewogenen Glasfritte abgesaugt und mit wenig Wasser gewaschen. Das Filtrat wurde mit Äther ausgeschüttelt, die Oberphase mit Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Die beiden das Aglykon enthaltenden Gefäße wurden 2 Stdn. bei 105° getrocknet. 25.8 mg entspreched einem Aglykonanteil von 43.5% (gef.), ber. 46.6%.
Aus verdünntem Aceton kristalliserte das Isosakuranetin aus. Schmp.: 190 - 192°. Der Mischschmelzpunkt mit authentischem Isosakuranetin blieb ohne Depression.

bb. Die Zuckerlösung wurde nach Zugabe von Di-N-Octylamin, 1:10 in Chloroform gelöst, durch Ausschütteln neutralisiert, am Rotationsverdampfer eingeengt und mit einer Lösung von 60 mg frisch umkristallisiertem Phenylhydrazinhydrochlorid und 90 mg Natriumacetat in 1.5 ml Wasser versetzt. In einem Reagenzglas, das mit einem Korken mit Steigrohr versehen war, wurde die Lösung 45 Min. durch Eintauchen in ein Becherglas mit kochendem Wasser erhitzt. Das ausgefallene Mischosazon wurde abfiltriert, getrocknet und vorsichtig mit 1 ml Aceton versetzt. Dabei löste

sich das Rhamnosazon. Es wurde aus 30% Äthanol kristallisiert. Rhamnosazon Schmp.:178 - 181°, Glucosazon Schmp.:205 - 207°.

3. Permethylierung von Didyminacetat bzw. Didymin und Analyse der Methylzucker

a) 100 mg Didyminheptaacetat wurden in 2 ml DMF (Uvasol, Merck) gelöst und mit 30 mg Bariumhydroxid p.a., 690 mg Bariumoxid (peroxidfrei, gepulvert, Degussa) sowie 3 ml Methyljodid versetzt. Unter Feuchtigkeitsausschluß wurde 16 Stdn. bei 25° in Stickstoffatmosphäre geschüttelt und anschließend mit 65 ml Chloroform verdünnt und vom Rückstand abzentrifugiert. Nach üblicher Aufarbeitung und Trocknen des Permethylproduktes über P_2O_5 im Exsikkator im Vakuum erhielten wir 73.9 mg Permethyldidymin (94% der Theorie).

Chromatographie:
Kieselgelplatte, Benzol-Äthanol (8:2)
R_f-Wert 0.59; Rotfärbung mit H_2SO_4

b) 109 mg Didymin wurden in 2 ml reinstem DMSO gelöst und bei 0° unter Stickstoff mit 21 mg Bariumhydroxid $\cdot 8\ H_2O$ und 500 mg peroxidfreiem Bariumoxid versetzt. Nach Zusatz von 300 mg frisch aktiviertem Drierite und 3 ml Methyljodid wurde bei Raumtemperatur in einer Stickstoffatmosphäre 41 Stdn. lang methyliert. Nach üblicher Aufarbeitung erhielten wir 0.101 g eines halbfesten, chromatographisch reinen Permethylierungsproduktes (82% der Theorie).

Chromatographie: siehe oben.

c) 70 mg permethyliertes Didymin wurden in einer Ampulle mit 5% methanolischer Salzsäure bei 80° hydrolysiert. Nach Verdünnen und Absaugen der ausgefallenen Aglykone wurde die Lösung mit 5 ml 1 n HCl versetzt und 2 Stdn. auf dem Wasserbad erhitzt. Wir neutralisierten mit Dowex (1x8) und engten die Lösung ein.

Chromatographie:
Kieselgelplatte, Benzol-Aceton (1:1)

2,3,4-Tri-O-methyl-L-rhamnose	R_f 0.66
2,3,4-Tri-O-methyl-D-glucose	R_f 0.36

Braunfärbung mit Anilinhydrogenphthalat bei 110°

Gaschromatographie:
Auf 2 m x 4 mm Säule mit 15% Polyphenyläther in Gaschrom Q Temperatur 170°. Papiervorschub 5 Min./inch. Gasdurchfluß 77 ml/Min.

Retentionszeit für:

2,3,4-Tri-O-methyl-L-rhamnose	27.5 Min.
2,3,4-Tri-O-methyl-D-glucose	43.0 Min.
2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose	31.2 Min. (Standard)

4. 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7-β-[6-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid]-heptaacetat (Didyminheptaacetat)

100 mg Didymin wurden bei 25° mit 1 ml Pyridin und 1 ml Essigsäureanhydrid über Nacht acetyliert. Nach üblicher Aufarbeitung erhielten wir 110 mg Heptaacetat (Ib). Farblose Nadeln aus abs. Äthanol. Schmp. = 116 - 119° (Lit.[78]: Schmp. 105 - 106°). Ausbeute: 75.7% der Theorie.

$[\alpha]_D^{26} = -38.0°$ (c = 1.3 in $CHCl_3$)

$C_{42}H_{48}O_{21}$ (888.8) ber. C 56.73 H 5.45 7 CH_3CO 33.9
gef. C 56.80 H 5.39 7 CH_3CO 34.6

Chromatographie: Kieselgelplatte, Äther-Toluol (2:1)
R_f-Wert 0.51; Schwarzfärbung mit H_2SO_4 bei 150°.

KMR-Spektrum (in $CDCl_3$, int. TMS):

Acetyl: δ = 2.3 - 2.4 ppm (C-5-OAc, 3 Protonen);
δ = 1.95- 2.15 ppm (18 Protonen)

Aglykon: H-2: δ = 5.55 ppm (Quart.);
H-6: δ = 6.33 ppm (Dubl., J = 2.5 cps);
H-8: δ = 6.5 ppm (Dubl., J = 2.5 cps);
H-3', H-5': δ = 6.95 ppm (Dubl., J = 9 cps);
H-2', H-6': δ = 7.38 ppm (Dubl., J = 9 cps);

Rhamnoglucosyl:

Rhamnose-CH_3: δ = 1.18 ppm (Dubl., J = 6 cps);
Glucose-H-5,6,6, Rhamnose-H-5 und 4'-Methoxyl: δ = 3.6 - 4.0 ppm (4 + 3 Protonen);
Glucose-H-1,2,3,4 und Rhamnose-H-2,3,4: δ = 5.1 - 5.4 ppm (7 Protonen);
Rhamnose-H-1: δ = 4.72 ppm (J = 1 cps).

IV. SYNTHESE VON GLYKOSIDEN DES ISOSAKURANETINS

1. Synthese des Isosakuranetins

a) 5,7-Dihydroxy-4'methoxy-flavanon (Isosakuranetin) nach SHINODA u. SATO[73] modif.)

Zu einer Lösung von 4.5 g wasserfreiem Phloroglucin in 75 ml wasserfreiem Nitrobenzol wurden unter starker Kühlung 5.5 g frisch bereitetes p-Methoxyzimtsäurechlorid in 35 ml abs. Äther gelöst, gegeben. Portionsweise fügten wir 10 g fein verriebenes, wasserfreies Aluminiumchlorid dazu. Die klare Lösung wurde mit 10 g frisch aktiviertem Drierite versetzt und 15 Stunden unter Feuchtigkeitsausschluß stehen gelassen. Dann wurde das Nitrobenzol mit Wasserdampf abdestilliert. Die resultierende wässrige Lösung wurde 5mal mit Dichlormethan ausgeschüttelt und die organische Phase, stark eingeengt, auf eine Säule mit 200 g Kieselgel (0.05-0.2) gegeben. Durchmesser 4 cm, Höhe 60 cm. Es wurde in steigender Polarität mit Benzol-Äthylacetat chromatographiert. Bei einem Äthylacetatanteil von 30% wurden 6 Fraktionen zu 200 ml aufgefangen. Die Fraktionen 2-5 enthielten Isosakuranetin (II), das aus 50%igem Aceton in gelblich-weißen Nadeln kristallisiert werden konnte.

Die Mutterlaugen wurden in 10% KOH gelöst. Dann wurden mit Chloroform einige Begleitstoffe ausgeschüttelt. Durch Einleiten von Kohlendioxid in die alkalische Lösung fiel nach etwa einer Stunde im leicht sauren Milieu weiteres Isosakuranetin aus. Es wurde aus 50% Aceton kristallisiert. Ausbeute = 2.65 g (30.8% der Theorie). Lit.[78]: Ausbeute 10%. Schmelzpunkt: 190 - 193°. Der Mischschmelzpunkt mit aus Didymin gewonnenem Isosakuranetin blieb ohne Depression.
Das IR-Spektrum war mit dem des natürlich gewonnenen Isosakuranetins identisch.
Chromatographie: siehe Seite 101.

b) 5,7-Diacetoxy-4'-methoxy-flavanon (Isosakuranetindiacetat)
100 mg Aglykon wurden mit 1 ml Pyridin und 1 ml Essigsäureanhydrid 15 Stdn. bei Raumtemperatur acetyliert. Das Acetat (IIa) kristallisierte in langen Nadeln aus 96% Äthanol. Ausbeute = 112 mg (84.8% der Theorie) Schmp.: 120 - 121°. Lit.[78]: Schmp. 115 - 116°.

2. Synthese von 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7-mono-β-D-glucosid (Isosakuranetin-7-glucosid = Isosakuranin)

0.12 g Isosakuranetin (II) wurden in 1 ml Chinolin gelöst und mit 0.14 g Silbercarbonat und 0.16 g Drierite 30 Min. geschüttelt. Nach Zugabe von 0.18 g α-Acetobromglucose wurde weitere 2 Stdn. unter Lichtabschluß geschüttelt. Wir verdünnten mit 10 ml Chloroform, zentrifugierten von den Silbersalzen ab, engten die Lösung im Vakuum ein und tropften sie in 25 ml 10% Essigsäure ein. Wir entacetylierten durch 20-minütiges Stehenlassen mit 20 ml 1.8 mol. Natriummethylatlösung bei 0°, neutralisierten mit Essigsäure und verdünnten mit 40 ml Wasser. Zur Entfernung des Chinolins wurde 3mal mit je 50 ml Petroläther ausgeschüttelt. Nicht umgesetztes Aglukon wurde durch sechsmalige Extraktion mit einer Chloroform-Petroläther-(6:4) Mischung und zweimalige Nachextraktion mit 30 ml Chloroform entfernt. Anschließend wurde 10mal mit je 50 ml Äthylacetat ausgeschüttelt. Aus den vereinigten Lösungen erhielten wir nach Umkristallisieren aus Aceton 0.092 g Isosakuranin (III) vom Schmp. 183 - 186°. Lit.[80]: Schmp. 184 - 186°. Mit dem durch partielle Hydrolyse aus isoliertem Didymin erhalten Glucosid entstand im Mischschmelzpunkt keine Depression. Ausbeute: 48.8% der Theorie.

Das bei 120° im H.V. getrocknete Glykosid enthält nach Karl Fischer 1 Mol Kristallwasser (gef. 4.24%, ber. 4.0%).

$C_{22}H_{24}O_{10} \cdot H_2O$ (466.4)	ber.	C 56.65	H 5.62	1 OCH_3	6.64
	gef.	C 56.27	H 5.70	OCH_3	7.01

IR-Spektrum auf Seite 49.
Chromatographie: siehe Seite 101.

3. Synthese von Isosakuranetin-7-cellobiosid

a) 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7-β-[4-O-β-D-glucopyranosyl-D-glucopyranosid]-heptaacetat (Isosakuranetin-7-cellobiosyl-heptaacetat)

0.375 g Isosakuranetin (II) wurden in einer Mischung aus 1 ml Chloroform und 6 ml frisch destl. Chinolin gelöst und mit 0.43 g Silbercarbonat und 0.5 g Drierite 30 Min. geschüttelt. Nach Zugabe von 1.6 g α-Acetobromcellobiose wurde weitere 2 Stdn. geschüttelt. Die Reaktionsmischung wurde mit 10 ml Chloroform verdünnt und von Silbersalzen abzentrifugiert. Die vom Chloroform befreite Lösung wurde in 100 ml 10% Essigsäure getropft. Nach Filtration wurde der Rückstand mit Methanol vom Filter gelöst. Ein Rest von Silbersalzen blieb auf dem Filter zurück. Nach kurzer Zeit fiel aus der bei 0° aufbewahrten Lösung ein kristalliner Niederschlag aus. Schmp.: 128 - 130°. Ausbeute: 0.66 g (60.0% der Th.).

$C_{42}H_{48}O_{22}$ (904.4) ber. C 55.72 H 5.35
gef. C 56.01 H 5.42

Chromatographie:
Kieselgelplatte, Äther-Toluol (1:1)
R_f-Wert 0.14 (Isosakuranetin 0.48)
Schwarzfärbung mit H_2SO_4 bei 150°.

b) 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7-β-[4-O-β-D-glucopyranosyl-D-glucopyranosid] (Isosakuranetin-7-cellobiosid)

0.5 g des Isosakuranetincellobiosylheptaacetates wurden bei 0° mit einer Lösung von 0.22 g Natrium in 50 ml Methanol 10 Min. entacetyliert. Nach Neutralisation mit Essigsäure wurde das Glykosid aus verdünntem Methanol kristallisiert. Weiße Nadeln vom Schmelzpunkt 258 - 262°. Ausbeute: 0.263 g (78% der Theorie). Das Glykosid verliert im Hochvakuum bei 120° ein Mol Kristallwasser.

Trocknung bei 118°, 12-15 Torr: $C_{28}H_{34}O_{15} \cdot H_2O$ (628.5)

ber. C 53.35 H 5.77 gef. C 53.56 H 5.71

Trocknung bei 120°, Hochvakuum: $C_{28}H_{34}O_{15}$ (610.5)

ber. C 55.05 H 5.62 gef. C 54.95 H 5.69

Chromatographie:
Kieselgelplatte, Äthylacetat-Methanol-Wasser (80:14:10)
Isosakuranetincellobiosid R_f 0.41
Gelbgrün im UV-Licht bei 360 mμ

4. Synthese des Didymins

a) α-1-Brom-2,3,4,2',3',4'-hexa-acetyl-rutinose (α-Acetobromrutinose) stellten wir nach ZEMPLEN[31] aus Rutin dar. Rutinose (50 g) wurde dabei mit 10% Essigsäure aus Rutin abgespalten und als Acetat kristallisiert(9g).Die Ausbeute des daraus dargestellten Acetobromzuckers konnten wir auf einfache Art verbessern. Statt das Acetat in der zehnfachen Menge Chloroform zu lösen, verwendeten wir Dichlormethan. Es löst das Acetat wesentlich besser, kann in dreimal geringer Menge eingesetzt werden und verdünnt damit den zugesetzten Bromwasserstoff in Eisessig (Fa. Merck) wesentlich weniger. Zudem kann Dichlormethan bei der Aufarbeitung schonender abdestilliert werden. Wir erhielten die α-Acetobromrutinose aus Äther-Petroläther in langen Nadeln vom Schmp. 132° in 73%iger Ausbeute.

b) 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7-β-[6-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid]-hexaacetat (Isosakuranetin-7-rutinosyl-hexaacetat = Didymin-hexaacetat)
0.534 g synth. Isosakuranetin (II) wurden in 8 ml Chinolin mit 0.648 g Silbercarbonat und 0.9 g Drierite 30 Min. geschüttelt. Nach Zugabe von 1.53 g Acetobromrutinose, hergestellt nach ZEMPLEN u. GERECS[31], wurde weitere 3 Stdn. unter Lichtabschluß geschüttelt. Die Suspension wurde in 10 ml Chloroform aufgenommen und die Silbersalze abzentrifugiert. Nach Entfernung des Chloroforms im Vakuum wurde die Lösung unter Rühren in 120 ml 10%ige Essigsäure getropft. Die sich absetzende dunkelbraune Lösung wurde durch azeo-

trope Destillation mit Benzol wasserfrei gemacht und auf eine Silicagel-Säule (Durchmesser 5 cm, Höhe 40 cm) aufgetragen. Elution mit Toluol-Äthylacetat (8:3) lieferte in den ersten Fraktionen unverändertes Isosakuranetin und in den nachfolgenden Fraktionen das Kupplungsprodukt. $FeCl_3$-Reaktion: grün. Schmp.: 132 - 134°. Ausbeute: 0.748 g (50.8% d.Th.)

$C_{40}H_{46}O_{20}$ (846.8) ber. C 56.73 H 5.48
gef. C 56.45 H 5.48

c) 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7-β-[6-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid] (Isosakuranetin-7-rutinosid = Didymin)
0.72 g Didyminhexaacetat wurden in 10 ml Methanol gelöst und mit 100 ml 1.8 n Natriummethylatlösung versetzt. Nach 20-minütigem Stehenlassen bei 0° wurde mit Essigsäure neutralisiert. Wir schüttelten die wässrige Lösung mit Äthylacetat aus und erhielten nach Kristallisation aus verdünntem Methanol 279.8mg Didymin (I). Aus der Mutterlauge konnten durch Silicagelsäulenchromatographie mit Äthylacetat-Methanol-Wasser (80:14:10) noch weitere 125 mg Didymin erhalten werden. Ausbeute: 404.8 mg (77.7% d.Th.). Schmp., nach mehrmaligem Umkristallisieren aus verdünntem Methanol: 209 - 211°. In allen Kriterien bestand Übereinstimmung mit isoliertem Didymin.
Das bei 120° im Hochvakuum getrocknete Glykosid enthält nach Karl Fischer 1 Mol Kristallwasser (ber. 3.03%, gef. 3.4%).
UV (in Methanol p.a.) λ_{max} ($\log \varepsilon$) 287 mμ (4.14)
Infl. 332 mμ (3.42)

$[\alpha]_D^{20} = -100.9°$ (c = 1.4 in Methanol)

$C_{28}H_{34}O_{14} \cdot H_2O$ (612.6) ber. C 54.89 H 5.93 1 OCH_3 5.08
gef. C 54.85 H 5.89 OCH_3 5.41

IR-Spektrum auf Seite 51.

Chromatographie: siehe Seite 101

d) 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7-β-[6-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid]-heptaacetat (Isosakuranetin-7-rutinosyl-heptaacetat = Didyminheptaacetat)

0.118 g synth. Didymin wurden mit 1 ml Pyridin, 1 ml Acetanhydrid und einem Tropfen DMF durch 15-stündiges Stehen acetyliert. Nach üblicher Aufarbeitung erhielten wir 0.162 g Heptaacetat (Ib) vom Schmp. 116 - 119° (94.2% d.Th.). Kristalle aus abs. Äthanol. Der Mischschmp. mit dem aus natürlichem Didymin gewonnenen Heptaacetat war ohne Depression.

KMR-Spektrum auf Seite 44

Chromatographie: siehe Seite 104

5. Didymin aus Naringenin-7-β-rutinosyl-hexaacetat durch partielle Methylierung

Wir lösten 0.200 g Naringeninrutinosylhexaacetat (Va) in 5 ml Methanol p.a., gaben 10 ml ätherische Diazomethanlösung dazu und ließen das verschlossene Gefäß 2 Stdn. bei Zimmertemperatur stehen. Dann destillierten wir den Äther ab und entacetylierten das Acetat mit 5 ml 1.8 n Natriummethylatlösung während 20 Min. bei 0°. Nach Neutralisation mit Essigsäure chromatographierten wir die Lösung auf 4 Bögen Papier 2043 b (Schleicher u. Schüll) mit 2% Essigsäure präparativ. Die getrockneten Papiere wurden unter dem UV-Licht betrachtet und die das Didymin enthaltenden Zonen ausgeschnitten. Die Papierstreifen wurden absteigend mit 75% Methanol chromatographiert. Aus der abtropfenden Flüssigkeit konnte das Didymin (I) kristallisiert werden. Der Schmp. lag nach Umkristallisieren bei 208 - 211°. Der Mischschmp. mit natürlichem Didymin war ohne Depression.

6. Synthese des Poncirins

a) 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7-β-[2-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid] (Isosakuranetin-7-neohesperidosid = Poncirin)

0.375 g Isosakuranetin (II) wurden in 4.8 ml frisch dest.

Chinolin gelöst. Nach Zugabe von 0.485 g Silbercarbonat und 0.70 g Drierite wurde 25 Min. geschüttelt. Dann wurde etwa 1 g α-Acetobromneohesperidose, in 3 ml abs. Chloroform gelöst, dazugegeben. Unter Lichtabschluß wurde 3 Stdn. geschüttelt. Dann gaben wir die von Silbersalzen abzentrifugierte, in Chloroform gelöste Mischung in 100 ml 10% Essigsäure und entfernten so die Hauptmenge des Chinolins. Nach Entacetylierung mit 1.8 m Natriummethylatlösung wurde mit Wasser verdünnt, mit Eisessig neutralisiert und 6 mal mit 50 ml Hexan-Äther (6:4) zur Entfernung von Chinolin und Isosakuranetin ausgeschüttelt. Mit insgesamt 50 ml Äther wurde zweimal nachextrahiert. Schließlich schüttelten wir 15mal mit je 50 ml Äthylacetat aus, vereinigten diese Lösungen, trockneten mit Natriumsulfat und engten im Vakuum ein. Das chromatographisch nur wenig verunreinigte Poncirin konnte nicht auskristallisiert werden. Es wurde daher über eine Silicagelsäule mit Äthylacetat-Methanol-Wasser (80:14:10) gereinigt. Die das Glykosid enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, vom Lösungsmittel befreit, in Isopropanol gelöst, mit Kohle geklärt und bei -20° aufbewahrt. Das Poncirin (IV) wurde als weißes, amorphes Pulver gewonnen und konnte aus abs. Äthanol in Form rosettenförmig angeordneter Nadeln kristallin erhalten werden. Schmp.: 211 - 212°. Der Misch-Schmp. mit aus Phloroacetophenon dargestelltem Poncirin war ohne jede Depression. Die Ausbeute betrug trotz erheblicher Verluste bei der Reinigung noch 0.125 g (16.4% d.Th.)
Das IR-Spektrum ist identisch mit dem des authentischen, natürlichen Glykosides (siehe Seite 64).

Das Glykosid verliert im Hochvakuum bei 150° ein Mol Kristallwasser. Nach Trocknung bei 120° und 15 Torr enthält das Glykosid noch ein Mol Kristallwasser.

$C_{28}H_{34}O_{14} \cdot H_2O$ (612.6) ber. C 54.89 H 5.93 1 OCH_3 5.08
gef. C 55.00 H 5.68 OCH_3 5.32

$C_{28}H_{34}O_{14}$ (594.58) ber. C 56.56 H 5.76
gef. C 56.38 H 5.81

Chromatographie: siehe Seite 125

b) 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7-β-[2-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid]-heptaacetat (Isosakuranetin-7-neohesperidosyl-heptaacetat = Poncirinheptaacetat)

47 mg Poncirin wurden mit 0.5 ml Pyridin und 0.5 ml Acetanhydrid sowie 1 Tropfen DMF durch 15-stündiges Stehen acetyliert. Ausbeute nach üblicher Aufarbeitung 66.0 mg (90% d. Th.). Weiße kleine Nadeln aus Isopropanol-Äthanol vom Schmp. 122 - 123°.

Der Mischschmelzpunkt mit aus Phloroacetophenon-neohesperidosid dargestelltem Poncirinacetat war ohne Depression.

KMR-Spektrum: siehe Seite 126

Chromatographie: siehe Seite 126

7. Poncirin aus Naringin durch partielle Methylierung

0.240 g Naringin wurden in 5 ml Methanol p.a. gelöst und mit 15 ml ätherischer Diazomethanlösung versetzt. Wir ließen das verschlossene Gefäß 25 Stdn. im Kühlschrank stehen, destillierten dann den Äther ab und chromatographierten die Lösung auf einer Polyamidplatte mit dem Fließmittel Nitrobenzol-Methanol (5:2). Das chromatographische Bild zeigte, daß das Naringin fast quantitativ umgesetzt war. Da jedoch neben Poncirin auch andere (unter dem UV-Licht als blau fluorescierende Flecke sichtbare) Substanzen entstanden waren, chromatographierten wir die Lösung auf einer Kieselgelsäule (1.5 x 15 cm) mit Äthylacetat-Methanol-Wasser (80:14:10). Die ersten gelblich gefärbten Fraktionen wurden vom Elutionsmittel befreit, mit absolutem Äthanol aufgenommen, mit Kohle geklärt und bei Raumtemperatur stehengelassen. Wir erhielten etwa 15 mg Poncirin, das nach zweimaligem Umkristallisieren aus abs. Äthanol einen Schmp. von 209 - 211° aufwies. Es war in jeder Beziehung mit vollsynthetisch dargestelltem Poncirin identisch.

V. SYNTHESE VON GLYKOSIDEN DES NARINGENINS

1. Naringenin-7-cellobiosid

a) 5,7,4'-Trihydroxy-flavanon-7-β-[4-O-β-D-glucopyranosyl-D-glucopyranosid]-heptaacetat (Naringenin-7-cellobiosyl-heptaacetat)

0.69 g Naringenin wurden in einer Mischung aus 1 ml Chloroform und 6 ml frisch dest. Chinolin gelöst und nach Zugabe von 0.8 g Silbercarbonat und 0.5 g Drierite 30 Min. geschüttelt. Dann wurden 1.72 g α-Acetobromcellobiose zugegeben. Nach zweistündigem kräftigen Schütteln unter Lichtabschluß wurde mit 10 ml Chloroform verdünnt und von den Silbersalzen abzentrifugiert. Die vom Chloroform befreite Lösung wurde in 100 ml 10% Essigsäure getropft. Nach Filtration von ausgefallenen Silbersalzresten wurde der ölige Rückstand mit Methanol vom Filter gelöst. Nach Verdünnen mit Wasser fiel aus der auf 0° abgekühlten Lösung ein Niederschlag aus. Er wurde auf eine Silicagelsäule (6 x 40) gegeben. Chromatographie mit Benzol-Äther (8:3) ergab in den ersten gefärbten Fraktionen unverändertes Naringenin, in den folgenden Fraktionen das gewünschte Naringenin-7-cellobiosyl-heptaacetat. Ausbeute: 1.08 g (49.1% d.Th.). Nadeln aus abs. Äthanol, Schmp.: 133 - 135°.

$C_{41}H_{46}O_{22}$ (890.7) ber. C 55.26 H 5.21 7 CH_3CO 33.7
gef. C 55.80 H 5.27 CH_3CO 30.6

Chromatographie:

Kieselgelplatte, Äther-Toluol (1:1)
R_f-Wert 0.12 (Naringenin 0.42)
Schwarzfärbung mit konz. H_2SO_4 bei 150°

b) 5,7-4'-Trihydroxyflavanon-7-β-[4-O-β-D-glucopyranosyl-D-glucopyranosid] (Naringenin-7-cellobiosid)

0.9 g des Naringenincellobiosylheptaacetates wurden bei 0° mit einer Lösung von 0.45 g Natrium in 100 ml Methanol

15 Min. entacetyliert. Nach Neutralisation mit Eisessig wurde das Glykosid aus verdünntem Methanol kristallisiert. Ausbeute: 0.468 g (78% d.Th.). Schm.: 213 - 216°. Das bei 120° im Hochvakuum getrocknete Glykosid enthält nach Karl Fischer 1 Mol Kristallwasser (ber. 2.93%, gef. 3.58%).

$[\alpha]_D^{23}$ = -46.37 (c = 1.07 in Pyridin)

$C_{27}H_{32}O_{15} \cdot H_2O$ (614.5) ber. C 52.56 H 5.57
gef. C 52.48 H 5.48

Chromatographie:

Kieselgelplatte, Äthylacetat-Methanol-Wasser (80:14:10)
R_f-Wert 0.38; gelbgrün im UV-Licht bei 360 mμ

2. Synthese des Narirutins

a) 5,7,4'-Trihydroxy-flavanon-7-β-[6-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid]-hexaacetat (Naringenin-7-rutinosyl-hexaacetat)

0.32 g Naringenin wurden in einer Mischung aus 0.5 ml Chloroform und 4 ml Chinolin gelöst und nach Zugabe von 0.42 g Silbercarbonat und 0.25 g Drierite 25 Min. geschüttelt. Dann wurden 0.80 g α-Acetobromrutinose zugegeben. Nach 2-stündigem kräftigen Schütteln unter Lichtabschluß wurde die Mischung, wie bei Naringenincellobiosylhexaacetat beschrieben, aufgearbeitet. Chromatographie an 2 Silicagelsäulen (4 x 40) mit Benzol-Äther (8:3) ergab in den ersten gefärbten Fraktionen unverändertes Naringenin, in den folgenden Fraktionen Naringenin-7-rutinosyl-hexaacetat (Va) und in den darauffolgenden eine nur chromatographisch nachweisbare, geringe Menge eines Kupplungsproduktes, vermutlich des Naringenin-4'-rutinosyl-hexaacetates. Ausbeute: 0.57 g (57.8% d. Th.). Weißes amorphes Pulver vom Schmp. 123 - 126°.

$[\alpha]_D^{23}$ = -49.90 (c= 1.02 in Chloroform)

$C_{27}H_{32}O_{14} \cdot H_2O$ (598.5) ber. C 54.18 H 5.72
gef. C 53.84 H 5.86

UV (Methanol p.a.) λ_{max} (log ε) 283 (4.22);
Inflex. 327 - 332 mμ (3.60)

Chromatographie:
Polyamidplatte, Nitromethan-Methanol (5:2)
Narirutin R_f 0.63; Naringin R_f 0.54
Gelbfärbung mit Aluminiumchloridlösung

c) 5,7,4'-Trihydroxy-flavanon-7-β-[6-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid]-octaacetat (Naringenin-7-rutinosyl-octaacetat = Narirutinoctaacetat)

0.563 g Naringeninrutinosyl-hexaacetat (Va) wurden mit 2 ml Pyridin und 2 ml Acetanhydrid bei Raumtemperatur 15 Stdn. acetyliert. Aus Äthanol erhielten wir nach üblicher Aufarbeitung 0.553 g weißes Naringenin-7-rutinosyl-octaacetat (Vb) vom Schmp. 121 - 124°. (Ausbeute: 64.2% d.Th.).

$[\alpha]_D^{30} = -43.8^\circ$ (c = 1.29 in Chloroform)

$C_{43}H_{48}O_{22}$ (916.9) ber. C 56.33 H 5.28 8 CH_3CO 37.57
gef. C 56.53 H 5.36 CH_3CO 37.90

KMR-Spektrum ($CDCl_3$, int. TMS)
Acetylgruppen: δ = 1.9 - 2.10 ppm (19 Protonen);
2.3 - 2.45 ppm (6 Protonen);

Aglykon: H-3: δ = 2.75 - 3.00 ppm (2 Protonen);
H-2: δ = 5.6 ppm (Quart.);
H-6: δ = 6.35 ppm (D, J = 2.5 cps);
H-8: δ = 6.55 ppm (D, J = 2.5 cps);
H-3', H-5': δ = 7.15 ppm;
H-2', H-6': δ = 7.48 ppm (D, J = 9 cps);

Rhamnoglucosyl: Rhamnose-CH_3: δ = 1.2 ppm (D, J = 6 cps);
Glucose-H-5, H-6 und Rhamnose-H-5:
δ = 3.6 - 4.0 ppm (4 Protonen);
Glucose-H-1,2,3,4 und Rhamnose-H-2,3,4:
δ = 5.1 - 5.3 ppm (7 Protonen);
Rhamnose-H-1: δ = 4.7 ppm (D, J = 1 cps)

Chromatographie: Kieselgelplatte,

a. Benzol-Äthanol (85:15) b. Äther Toluol (2:1)
Narirutinoctaacetat R_f 0.63; Narirutinoctaacetat R_f 0.46
Naringinoctaacetat R_f 0.49
Schwarzfärbung mit H_2SO_4 bei 150°

$C_{39}H_{47}O_{20}$ (832.8) ber. C 56.11 H 5.31 6 CH_3CO 30.94
gef. C 56.07 H 5.33 CH_3CO 30.58

KMR-Spektrum ($CDCl_3$, int. TMS)

A-Ring: H-6, H-8: δ = 6.1 - 6.25 ppm
B-Ring: H-2', H-6': δ = 7.25 - 7.45 ppm;
H-3', H-5': δ = 6.92 ppm (D, J = p cps)

offs. 500 Hz in DMSO: C-5 Hydroxyl: δ = 12.0 ppm
C-4'Hydroxyl: δ = 9.53 ppm

Chromatographie:
Kieselgelplatte, Benzol-Äthanol (85:15)
R_f-Wert 0.42; Schwarzfärbung mit H_2SO_4 bei 150°

b) 5,7,4'-Trihydroxy-flavanon-7-β-[6-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid] (Naringenin-7-rutinosid = Narirutin)
0.9 g des Naringeninrutinosylhexaacetates (Va) wurden bei 0° mit einer Lösung von 0.45 g Natrium in 100 ml Methanol über Nacht entacetyliert. Nach Neutralisation mit Eisessig wurde das Glykosid vom Methanol befreit, in 60 ml Wasser gelöst und durch 15maliges Ausschütteln mit Äthylacetat von wasserlöslichen Stoffen getrennt. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet, eingeengt und auf 2 Säulen (6 x 40) über Polyamid mit 10% Methanol chromatographiert. Wir erhielten chromatographisch reines Narirutin (V), das nicht kristallisiert werden konnte. Zur Abtrennung von geringen Anteilen an Polyamidmonomeren wurde nochmals über eine Silicagelsäule (6 x 40) mit Äthylacetat-Methanol-Wasser (80:14:10) chromatographiert. Wir erhielten amorphes, analysenreines, gelbes Narirutin. Eine geringe Menge konnte aus abs. Äthanol im Gefrierschrank kristallisiert werden. Gelbliche Plättchen vom Schmp. 160 - 165°. Zersetzungsbereich (unter Braunfärbung): 238 - 250°. $[\alpha]_D^{24}$ = -49.5° (c = 1.8 in Pyridin)

VI. SYNTHESE VON α-ACETOBROMNEOHESPERIDOSE

1. Synth. β-1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-glucopyranose

a) 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-β-D-glucopyranose

In einem Rundkolben wurden 150 g frisch geschmolzenes Natriumacetat und 2.1 l Acetanhydrid zum Sieden erhitzt. Dann wurden vorsichtig in kleinen Anteilen 300 g wasserfreie Glucose zugegeben, wobei darauf geachtet wurde, daß die Lösung infolge der entstehenden Reaktionswärme in ständig schwachem Sieden blieb. Nach vollständiger Zugabe des Zuckers wurde die Lösung kurz aufgekocht und später in 5 l Eiswasser gegossen. Das ausgefällte Acetat wurde nach 3 Stdn. abgesaugt, mit Wasser säurefrei gewaschen und in 2 l 95% heißem Äthanol gelöst, mit Kohle geklärt und heiß filtriert. Beim Erkalten schieden sich weiße Kristalle von β-D-Glucosepentaacetat ab, die nach Erreichen der Raumtemperatur sofort abgesaugt wurden. Ausbeute 216 g (33.2% d.Th.). Nach Umkristallisieren aus Äthanol schmolz das Acetat bei 133°.

b) 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-O-trichloracetyl-β-D-glucopyranosylchlorid nach LEMIEUX[99)]

In einem Rundkolben wurden 104 g β-D-Glucosepentaacetat mit 236 g pulverisiertem Phosphorpentachlorid vermengt, mit 53 ml Tetrachlorkohlenstoff versetzt und unter Rückfluß unter Ausschluß von Feuchtigkeit 6 Stdn. im kochenden Wasserbad erhitzt. Die klare, gelbliche Lösung wurde am Rotationsverdampfer bei etwa 15 Torr und einer Wasserbadtemperatur von ansteigend 30 - 80° eingeengt. Der sirupöse Rückstand wurde in 20 ml Dichlormethan gelöst, mit 200 ml abs. Äther versetzt und über Nacht bei -18° aufbewahrt. Das weiße Kristallisat wurde daraufhin abgesaugt, mit kaltem Methanol und dann mit kaltem Äther gewaschen und im Exsikkator über Diphosphorpentoxid aufbewahrt.

Rohausbeute: 37 g (29.3% d.Th.). Nach Umkristallisieren

aus Dichlormethan-Äther-Hexan erhielten wir 27.3 g 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-O-trichloracetyl-β-D-glucopyranosylchlorid vom Schmp. 139 - 140°. Lit.[99]: Schmp. 142°.

c) 3,4,6-Tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosylchlorid nach LEMIEUX[99]
In einem Modellansatz wurden 10 g fein verriebenes 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-O-trichloracetyl-β-D-glucopyranosylchlorid in ein eisgekühltes, mit 200 ml trockenem ammoniakgesättigtem Äther gefülltes Gefäß gegeben. Daraufhin wurde etwa 2 Min. kräftig geschüttelt, um möglichst schnell eine klare Lösung zu erhalten. Einige Sekunden nach Eintreten der Auflösung kristallisierte bereits ein Produkt in weißen Plättchen aus. Das Gefäß wurde noch 6 Minuten in ein Eisbad gestellt. Dann wurde abgesaugt, das Filtrat erneut in einem Eisbad gekühlt und nach 30 Min. abgesaugt. Wir erhielten 5.2 + 0.45 g 3,4,6-Tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosylchlorid vom Schmp. 138 - 141° (81.9% d.Th.). Durch Aufkochen des Produktes in Benzol und anschließendes Abkühlen bei Raumtemperatur erhielten wir nach dem Absaugen ein reineres Produkt vom Schmelzbereich 140 - 146°. Lit.[99]: Schmp. 156-158°.

d) 3,4,6-Tri-O-acetyl-α-D-glucopyranosylchlorid nach LEMIEUX[100]
8 g 3,4,6-Tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosylchlorid wurden in 500 ml wasserfreiem Aceton gelöst und 4 Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dabei erfolgte Isomerisierung zum α-Chlorid. Die trübe Lösung wurde dann filtriert, das Aceton unter vermindertem Druck abdestilliert und der verbleibende Rückstand in möglichst wenig siedendem Äther gelöst. Dann wurde mit Hexan bis zur beginnenden Trübung versetzt. Das gut verschlossene Gefäß wurde 2 Tage im Kühlschrank, dann einige Tage bei -18° aufbewahrt. Es bildeten sich lange, balkenförmige Kristalle von 3,4,6-Tri-O-acetyl-α-D-glucopyranosylchlorid. Ausbeute: 6.44 g (80.5% d.Th.). Schmp. = 91 - 93°. Nach Umkristallisieren aus Äther-Hexan lag der Schmp. bei 93 - 94°. Lit.[100]: Schmp. 93 - 94°.

e) 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranose nach LEMIEUX[100]
6.5 g 3,4,6-Tri-O-acetyl-α-D-glucopyranosylchlorid wurden mit 3.5 g Silberacetat in 100 ml Eisessig p.a. gelöst und 6 Stdn.

unter Lichtausschluß geschüttelt. Dann verdünnten wir mit 100 ml Benzol p.a., filtrierten von Silbersalzen ab, engten im Vakuum zur Trockene ein und erhielten einen weißen, festen Rückstand, der in Benzol gelöst und mit Hexan bis zur Trübung versetzt wurde. Das im Kühlschrank auskristallisierte 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosid wurde abgesaugt und aus Benzol-Äther-Hexan umkristallisiert. Schmp.: 135 - 136°. Lit.[100]: Schmp. 137 - 138°. Ausbeute: 5.1 g (72.5% d.Th.).

2. Synth. β-Acetyl-2-O-α-L-[2,3,4-tri-O-acetyl-rhamnopyranosyl]-3,4,6-tri-O-acetyl-D-glucopyranosid (β-Neohesperidoseheptaacetat) nach KOEPPEN[96]

Zu einer Lösung von 2 g 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranose, 0.6 g Quecksilbercyanid und 0.9 g Quecksilberbromid in 10 ml absolutem Acetonitril wurden 2 g α-Acetobromrhamnose gegeben. Nach 3-stündigem Stehenlassen im Kühlschrank engten wir zur Trockene ein, gaben 20 ml Chloroform dazu und filtrierten von den Salzen ab. Die Chloroformlösung wurde 3mal mit 10 ml n Kaliumbromidlösung, dann 2mal mit 5 ml Wasser ausgeschüttelt. Nach Trocknen der Lösung über Calciumchlorid engten wir im Vakuum ein, lösten den Rückstand in abs. Äthanol und erhielten daraus nach 2-tägigem Stehen im Kühlschrank 1.95 g β-Neohesperidose-heptaacetat vom Schmp. 151 - 153°. Lit.[94)96)]: Schmp. 152 - 153°. (Ausbeute 55.4% d.Th.).

Chromatographie:
Kieselgelplatte, Benzol p.a. - Methanol p.a. (92:8)
Neohesperidoseheptaacetat R_f 0.83
Rutinoseheptaacetat R_f 0.78
Schwarzfärbung mit H_2SO_4 bei 130°.

3. Synth. 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-O-α-L-[2,3,4-tri-O-acetyl-rhamnopyranosyl]-α-D-glucopyranosylbromid (Hexaacetyl-α-neohesperidosylbromid = α-Acetobromneohesperidose)

1.025 g β-Neohesperidoseheptaacetat wurden in 1.3 ml abs. Chloroform gelöst, im Eisschrank gekühlt, dann mit 4.1 ml eiskaltem 40% Bromwasserstoff in Eisessig versetzt und 1 Stde. bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt. Dann verdünnten wir mit 50 ml eiskaltem Chloroform, schüttelten mit 10 ml Eiswasser, dann mit 10 ml eiskalter, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und nochmals mit 10 ml Eiswasser aus. Die gut getrocknete organische Phase wurde im Vakuum eingeengt. Ausbeute etwa 1 g. Es gelang nicht, die α-Acetobromneohesperidose zu kristallisieren. Sie wurde daher in abs. Chloroform gelöst und sofort zur Kupplung weiterverarbeitet.

Chromatographie:
Kieselgelplatte, Benzol p.a. - Methanol p.a. (92:8)
α-Acetobromneohesperidose R_f 0.88 α-Acetobromrutinose 0.86
Spur von Verunreinigung bei R_f 0.57
Schwarzfärbung mit H_2SO_4 bei 130°.

VII. TOTALSYNTHESE VON PONCIRINCHALKON UND PONCIRIN

1. 2,4,6-Trihydroxyacetophenon-4-β-[2-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid] (Phloroacetophenon-4-neohesperidosid) nach ZEMPLEN[106]

0.280 g 2-Benzoyl-phoroacetophenon wurden in 10 ml Aceton gelöst, in Eis gekühlt und mit 0.56 ml 10% wässriger Kalilauge sowie etwa 0.65 g α-Acetobromneohesperidose, in Aceton gelöst, versetzt. Nach 24-stündigem Stehen bei Raumtemperatur schieden sich aus der Lösung Kaliumbromidkristalle ab. Es wurde noch eine Stunde am Rückfluß erwärmt, im Vakuum zur Trockene eingeengt, der Rückstand mit 3 ml Methanol und 2 ml 1 n Natriummethylat versetzt und über Nacht stehen gelassen. Nach Ansäuern mit Essigsäure und Eindampfen wurden zum Rückstand 5 ml Wasser gegeben. Nach einigen Stunden konnte das ausgeschiedene Gemisch von Phloroacetophenon, Phloroacetophenon-4-neohesperidosid und Benzoesäure abgesaugt werden. Durch gründliches Waschen mit Äther wurden Phloroacetophenon und Benzoesäure wieder gelöst und der Rückstand aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute: 92 mg (18% d.Th.). Nach Umkristallisieren aus Wasser schmolz das Phloroacetophenon-4-neohesperidosid bei 163 - 165°. Lit.[36]:Schmp. 164 - 166°. Es bestand Identität mit authentischem, aus Naringin gewonnenem Phloroacetophenon-4-neohesperidosid.

Chromatographie:
Kieselgelplatte, Äthylacetat-Methanol-Wasser (80:14:10)
R_f-Wert 0.36; Schwarzfärbung mit H_2SO_4 bei 150°.

2. 2,4,6-Trihydroxyacetophenon-4-β-[2-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid] (Phloroacetophenon-4-neohesperidosid) durch Alkaliabbau von Naringin nach HOROWITZ[36]

1.0 g Naringin wurde in 12 ml 25% Kalilauge unter einem Stickstoffstrom gelöst und 3 Stdn. am Rückfluß unter Sau-

erstoffausschluß erhitzt. Die erkaltete Lösung wurde mit verdünnter Salzsäure leicht angesäuert. Das im sauren Milieu ausfallende Phloroacetophenon-4-neohesperidosid wurde abgesaugt und aus Wasser mehrmals umkristallisiert. Weiße Nadeln vom Schmp. 165 - 168°. Lit.[36]: Schmp. 164 - 166°. Ausbeute: 0.431 g (53% d.Th.).

3. 2',4',6'-Trihydroxy-4-methoxy-chalkon-4'-β-[2-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid] (Poncirinchalkon)

2.4 g Phloroacetophenon-4-neohesperidosid wurden in 10 ml abs. Äthanol gelöst. Unter Eiskühlung wurden 30 ml 25% äthanolische Kalilauge dazugegeben. Dabei erstarrte die Lösung gallertig. In die Suspension wurden unter Kühlung 0.85 ml Anisaldehyd (entsprechend 1.4 Mol) eingetropft. Nach 30-stündigem Schütteln in einer Stickstoffatmosphäre bei 25 - 30° wurden erneut 0.08 ml Anisaldehyd zugetropft. Nach insgesamt 92-stündigem Schütteln wurde unter Eiskühlung mit Wasser stark verdünnt. Dabei entstand eine klare Lösung. Sie wurde mit eiskalter 3 n Salzsäure auf einen pH von 3 gebracht. Nach Abdestillieren der größten Menge Äthanol im Vakuum wurde das Kalium-chlorid mit Aceton ausgefällt, das Aceton im Vakuum wieder entfernt und die Lösung mit 30 ml Chloroform ausgeschüttelt. Aus dem wässrigen Rückstand schieden sich nach längerem Stehen im Eisschrank orangefarbene Kristalle aus. Sie wurden aus abs. Äthanol umkristallisiert. Nach nochmaligem Umkristallisieren aus Di-methylsulfoxid-Wasser schmolzen die Nadeln bei 198 - 201°. Ausbeute: 1.086 g 2',4',6'-Trihydroxy-4-methoxy-chalkon-4'-neohesperidosid (VI). (38.4% d.Th.).

$[\alpha]_D^{22} = -103.52^\circ$ (c = 1.13 in Pyridin)

$C_{28}H_{34}O_{14}$ (594.58) ber. C 56.56 H 5.76 1 OCH_3 5.08
gef. C 56.68 H 5.48 OCH_3 5.33

UV (Methanol): λ_{max} (log ε) 363 mμ (4.56)

Chromatographie:
Kieselgelplatte, Äthylacetat-Methanol-Wasser (80:14:10)
R_f-Wert 0.44

4. 2',4',6'-Trihydroxy-4-methoxy-chalkon-4'-β-[2-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid]octaacetat (Poncirinchalkonoctaacetat)

91 mg Poncirinchalkon (VI) wurden mit 0.9 ml Pyridin, 0.9 ml Acetanhydrid und 1 Tropfen DMF 14 Stdn. bei Raumtemperatur acetyliert. Nach üblicher Aufarbeitung erhielten wir 140 mg Poncirinchalkonacetat (VIa), das aus abs. Äthanol kristallisierte. Schmp.: 105 - 107°. Ausbeute = 99.5% d.Th..

$C_{44}H_{50}O_{22}$ (930.9) ber. C 56.77 H 5.41 8 CH_3CO 36.9
gef. C 56.80 H 5.13 CH_3CO 35.8

KMR-Spektrum ($CDCl_3$, int. TMS):
Acetyl: δ = 1.95 - 2.2 ppm (24 Protonen)
Aglykon: H-β, H-2, H-6: δ = 7.5 ppm (D, J = 16 cps);
H-3', H-5': δ = 6.82 ppm (S);
H-α: δ = 6.8 ppm (D, J = 16 cps);
H-3, H-5: δ = 6.9 ppm (D, J = 9 cps);
Rhamnoglucosyl: Rhamnose-CH_3: δ = 1.25 ppm (D, J = 6 cps);
Glucose-H-2,5,6,6, Rhamnose-H-5 und 4'-Methoxyl:
δ = 3.8 - 4.3 ppm (5 +3 Protonen)
Glucose-H-1,3,4 und Rhamnose-H-1,2,3,4 δ = 5.05 - 5.45 ppm (7 Protonen).

Chromatographie:
Kieselgelplatte, Äther-Toluol (2:1)
R_f-Wert 0.48; Schwarzfärbung mit H_2SO_4 bei 150°.

5. 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7-β-[2-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid] (Isosakuranetin-7-neohesperidosid = Poncirin)

0.253 g Chalkonglykosid (VI) wurden in 10 ml Pyridin gelöst, mit 40 ml Wasser verdünnt und über Nacht stehen gelassen. Die anfangs orange-rote Lösung war hellgelb geworden. Wir dampften die Lösung im Vakuum zur Trockene ein, entfernten Reste von Pyridin durch mehrmaliges Abdestillieren mit Äthanol und lösten den gelblichen Rückstand in abs. Äthanol. Nach etwa 30-stündi-

gem Stehenlassen schieden sich am Boden des Kölbchens gelblichweiße Nadeln in Rosettenform ab. Wir erhielten 0.181 g Poncirin (IV), entsprechend einer Ausbeute von 71.7%.
Aus der Mutterlauge erhielten wir durch Acetylierung des Trockenrückstandes noch 0.054 g Poncirinacetat, entsprechend 0.036 g Poncirin. Damit betrug die Gesamtausbeute 86% der Theorie.
Nach Reinigen mit Kohle und Umkristallisieren aus abs. Äthanol erhielten wir weiße Kristalle vom Schmp. 175 - 180°; nach weiterem dreimaligen Umkristallisieren aus abs. Äthanol war der Schmp. 211 - 212° erreicht. Lit.[74]: Schmp. 212 - 213°.
Das Glykosid verliert im Hochvakuum bei 150° 1 Mol Kristallwasser. Nach Trocknung bei 120° und 15 Torr enthält es noch 1 Mol Kristallwasser.

$[\alpha]_D^{26} = -97.2^\circ$ (c = 0.73 in Pyridin)

$C_{28}H_{34}O_{14} \cdot H_2O$ (612.6) ber. C 54.89 H 5.93 1 OCH_3 5.08
gef. C 54.63 H 5.94 OCH_3 5.41

UV(Methanol p.a.) λ_{max} (log ε) 283 mμ (4.26)
Infl. 330 mμ (3.53)

Chromatographie:
Kieselgelplatte, Äthylacetat-Methanol-Wasser (80:14:10)
Poncirin R_f 0.49 Didymin 0.47

6. 5,7 -Dihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7-β-[2-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid]-heptaacetat (Poncirinheptaacetat)

0.474 g Poncirin wurden mit 4 ml Pyridin und 4 ml Acetanhydrid sowie 2 Tropfen DMF 14 Stdn. bei Raumtemperatur acetyliert. Nach üblicher Aufarbeitung erhielten wir 648 mg Poncirinheptaacetat (IVa), entsprechend 94.2% d.Th.. Nadeln aus Äthanol-Isopropanol vom Schmp. 122 - 123°.

$[\alpha]_D^{26} = -33.6^\circ$ (c = 1.37 in Chloroform)

$C_{42}H_{48}O_{21}$ (888.8) ber. C 56.75 H 5.44 7 CH_3CO 33.9
gef. C 56.98 H 5.41 CH_3CO 33.7

KMR-Spektrum ($CDCl_3$, int. TMS):

Acetyl: δ = 1.95 - 2.15 ppm (18 - 19 Protonen); 2.35 ppm (3 Protonen, C-5-Acetyl)

Aglykon: H-2: δ = 5.55 ppm;
H-6: δ = 6.35 ppm (D, J = 2.5 cps);
H-8: δ = 6.6 ppm (D, J = 2.5 cps);
H-3', H-5': δ = 6.95 ppm (D, J = 9 cps);
H-2', H-6': δ = 7.42 ppm (D, J = 9 cps);

Rhamnoglucosyl: Rhamnose-CH_3: δ = 1.20 ppm (D, J = 6 cps);
Glucose-H-2,5,6,6, Rhamnose-H-5 und Methoxyl in C-4': δ = 3.8 - 4.3 ppm (5 + 3 Prot.);
Glucose-H-1,3,4 und Rhamnose-H-1,2,3,4: δ = 5.0 - 5.6 ppm (7 Protonen).

Chromatographie:
Kieselgelplatte, Äther-Toluol (2:1)
Poncirinacetat R_f 0.52; Schwarzfärbung mit H_2SO_4 bei 150°.

VIII. IDENTITÄT VON ACACIIN AUS ROBINIA PSEUDOACACIA L. MIT LINARIN AUS LINARIA VULGARIS MILL.

1. Isolierung

1 kg getrocknete Blätter von Robinia pseudoacacia L. wurden grob gemahlen und im Sikkotopf bei 1 atü mit 10 l Wasser gekocht. Nach 1 Stde. wurde die Lösung abfiltriert und der Rückstand gut ausgepreßt. Der Vorgang wurde 2mal wiederholt. Die vereinigten Lösungen wurden mit 100 ml basischer Bleiacetatlösung versetzt, um störende Verunreinigungen zu fällen. Der abfiltrierte Niederschlag wurde noch 2mal mit je 1 l Wasser ausgekocht und wiederum filtriert. Die vereinigten Lösungen wurden über Nacht bei 0° stehengelassen. Vom ausgefallenen Rohacaciin wurde sodann abfiltriert. Abweichend von früher beschriebenen Isolierungen lösten wir nun das Rohacaciin erneut in heißem Wasser, schüttelten später 3mal mit Chloroform aus, wobei sich störende Emulsionsbildung durch Zusatz von wenig Amylalkohol weitgehend verdrängen ließ, und verwarfen die organischen Phasen. Anschließend extrahierten wir die Flavonoide durch 10maliges Ausschütteln mit je 500 ml Äthylacetat. Diese vereinigten Lösungen wurden mit Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum zur Trockene eingeengt und in Methanol gelöst. Aus Methanol fiel im Eisschrank ein amorpher flockiger Niederschlag aus. Er erwies sich chromatographisch als ein Gemisch von viel Acaciin und 3 anderen, polareren Flavonoidglykosiden. Weder durch Umkristallisieren aus wässrigem Methanol noch wässrigem Pyridin, noch Essigsäure ließen sich die Begleitflavonoide abtrennen. Das stets anfallende Rohacaciin vom Schmelzbereich 258 - 264° wurde daher auf Kieselgelsäulen (Kieselgel Merck 0.05 - 0.2) von 4 cm Durchmesser und 60 cm Länge mit dem Eluens Äthylacetat-Methanol-Wasser (80:14:10) gereinigt. Die ersten gelblich gefärbten Fraktionen enthielten reines Acaciin. Wir erhielten aus

Methanol 0.525 g in weißen Nadeln kristallisierendes Acaciin (VII) vom Schmelzpunkt 263 - 266°. Durch Umkristallisieren aus wässrigem Pyridin konnte der Schmelzpunkt auf 275 - 276° erhöht werden. Ausbeute: 0.05%.

2. Identitätsprüfung

Im Mischschmelzpunkt mit auth. Linarin (VIII) aus Linaria vulgaris MILL. entstand keine Depression.

Das bei 120° im Hochvakuum getrocknete Glykosid enthält nach Karl Fischer 1 Mol Kristallwasser (ber. 3.0%; gef. 2.8%).

$[\alpha]_D^{24} = -90.3^\circ$ (c = 0.1 in Pyridin)

Für Linarin[114]: $[\alpha]_D^{24} = -87.0^\circ$ (c = 0.05 in Pyridin)

$C_{28}H_{32}O_{14} \cdot H_2O$ (610.6) ber. C 55.13 H 5.66
gef. C 55.08 H 5.61

UV (in Methanol p.a.): λ_{max} ($\log \varepsilon$) 269 (4.27), 339 mμ (4.25)

Chromatographie:
Kieselgelplatte, Äthylacetat-Methanol-Wasser (80:14:10)
Linarin, Acaciin R_f 0.40
Gelbfärbung mit bas. Bleiacetatlösung.

5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-flavon-7-β-[6-O-α-L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid]-heptaacetat (Acaciinheptaacetat = Linarinheptaacetat)

60 mg Acaciin wurden mit 0.6 ml Acetanhydrid, 0.6 ml Pyridin und 1 Tropfen DMF 15 Stdn. bei Raumtemperatur acetyliert. Nach üblicher Aufarbeitung erhielten wir 81 mg Acaciinheptaacetat (VIIa). Es kristallisierte aus abs. Äthanol in weißen Nadeln vom Schmp. 123 - 125°. (Ausbeute 91.2% d.Th.). Im Mischschmelzpunkt mit auth. Linarinheptaacetat (VIIIa) trat keine Depression ein.

$C_{42}H_{46}O_{21}$ (886.8) ber. C 56.83 H 5.23
gef. C 56.72 H 5.35

KMR-Spektrum (in $CDCl_3$, int. TMS):

Aglykon: C-5-OAc: δ = 2.45 ppm (3 Protonen);
H-3: δ = 6.52 ppm;
H-6: δ = 6.65 ppm (D, J = 2.5 cps);
H-3', H-5' und H-8: δ = 6.9 - 7.15 ppm;
H-2', H-6': δ = 7.83 ppm (D, J = 9 cps);

Rhamnoglucosyl: Rhamnose-CH_3: δ = 1.18 ppm (D, J = 6 cps);
Acetylgruppen: δ = 1.9 - 2.2 ppm (18 Protonen);
4'-Methoxyl, Glucose H-5, H-6, Rhamnose H-5:
δ = 3.7 - 4.0 ppm (4 + 3 Protonen);
Glucose H-1,2,3,4, Rhamnose H-2,3,4:
δ = 5.1 - 5.4 ppm (7 Protonen);
Rhamnose H-1: δ = 4.75 ppm (D, J = 1 cps).

Chromatographie:
Kieselgelplatte, Äther - Toluol (2:1)
Linarinacetat, Acaciinacetat 0.20
Fortunellinacetat R_f 0.16
Schwarzfärbung mit H_2SO_4 bei 150°

IX. DEHYDRIERUNG DER SYNTHETISIERTEN FLAVANONRHAMNOGLUCOSIDE ZU DEN STRUKTURANALOGEN FLAVONGLYKOSIDEN

1. Dehydrierung von Didymin zu Linarin

a) 0.765 g Isosakuranetin-7-rutinosylheptaacetat (Ib) wurden in 7.5 ml Eisessig gelöst und nach Zugabe von 0.765 g Kaliumacetat, 0.390 g Jod und 1.2 ml Acetanhydrid 24 Stdn. am Rückfluß erhitzt. Die abgekühlte Lösung wurde in 100 ml 0.5% eisgekühlte Kaliumjodidlösung eingetropft. Nach einer Stunde wurde die Lösung durch Zugabe einer geringen Menge Natriumbisulfit entfärbt. Durch Verdünnen mit Wasser entstand ein Niederschlag, der abgesaugt, getrocknet und mit 50 ml 1.8 n Natriummethylatlösung bei 0° behandelt wurde. Nach 20 Minuten neutralisierten wir mit Essigsäure und verdünnten die Lösung mit Wasser auf etwa das doppelte Volumen. Nach 24 Stdn. saugten wir das ausgefallene rohe Acacetin-7-rutinosid ab. Nach Klären mit Kohle und mehrmaligem Umkristallisieren aus wässrigem Pyridin erhielten wir reines Linarin (VIII) in feinen weißen Nadeln vom Schmp. 275 - 277°. Lit.[122]: Schmp. 274 - 276. Mischschmelzpunkt mit auth. Linarin: ohne Depression. Ausbeute: 92 mg (18% d.Th.).
Das im Vakuum bei 150° und 15 Torr getrocknete Glykosid verliert 1 Mol Kristallwasser.

$[\alpha]_D^{22} = -88.2°$ (c = 1.1 in Pyridin); Lit.[114]:
$[\alpha]_D^{24} = -87.0°$ (c = 0.05 in Pyridin)

$C_{28}H_{32}O_{14}$ (592.6) ber. C 56.75 H 5.44
gef. C 57.03 H 5.90

UV (Methanol p.a.) λ_{max} (log ε) 269 mμ (4.27)
339 mμ (4.25)

KMR-Spektrum auf Seite 68.

Chromatographie:
Polyamidplatte; Nitromethan-Methanol (65:30)

Linarin R_f 0.59; Fortunellin R_f 0.55

b) Das in üblicher Weise hergestellte Acetat(VIIIa) gab im Mischschmelzpunkt mit authentischem Linarinheptaacetat keine Depression. Schmp. 123 - 125°. Lit.[113]: Schmp. 123 - 125°. Ausbeute: 85.6% d.Th.

$C_{42}H_{46}O_{21}$ (886.8) ber. C 56.83 H 5.23
gef. C 56.72 H 5.35

KMR-Spektrum siehe Seite 129
Chromatographie siehe Seite 129

2. Dehydrierung von Narirutin zu Apigenin-7-rutinosid (Isorhoifolin)

a) 0.50 g Naringeninrutinosyloctaacetat (Vb) wurden in 5.5 ml Eisessig gelöst, mit 0.55 g Kaliumacetat, 0.26 g Jod und 1 ml Acetanhydrid 18 Stdn. in der Siedehitze dehydriert. Nach Reinigung wies das Chromatogramm noch einen starken Flecken von nicht umgesetztem Narirutinoctaacetat auf. Das getrocknete Acetatgemisch wurde daher erneut mit 0.46 g Kaliumacetat, 4 ml Eisessig, 1 ml Acetanhydrid und 0.20 g Jod über Nacht am Rückfluß erhitzt. Nach der unter Linarin beschriebenen Aufarbeitung und Entacetylierung erhielten wir aus verdünntem Methanol chromatographisch reines Apigenin-7-β-rutinosid (IX) in gelblich-weißen Nadeln. Ausbeute 0.197 g (56.6% d.Th.). Schmelzpunkt nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol: 268 - 270°. Lit. 124): Schmp. 269 - 270°.
Das im Vakuum bei 150° und 15 Torr getrocknete Glykosid verliert 1 Mol Kristallwasser.

$[\alpha]_D^{23} = -98.2°$ (c = 1.1 in Pyridin)
$[\alpha]_D^{23} = -91.2°$ (c = 0.27 in DMF) Lit.[124]: $[\alpha]_D^{18} = -92.0°$ (c = 0.1 DMF)

$C_{27}H_{30}O_{14}$ (578.5) ber. C 56.04 H 5.23
gef. C 55.84 H 5.16
UV (Methanol p.a.) λ_{max} (log ε) 268 (4.59), 338 mμ (4.66)

Chromatographie:
Polyamidplatte, Nitromethan-Methanol (65:35)
Apigeninrutinosid R_f 0.24
Rhoifolin R_f 0.21
Gelbfärbung mit bas. Bleiacetatlösung

b) 60 mg Apigeninrutinosid (IX) wurden mit 0.6 ml Pyridin und 0.6 ml Acetanhydrid sowie 1 Tropfen DMF 15 Stdn. bei Raumtemperatur acetyliert. Wir erhielten nach üblicher Aufarbeitung aus abs. Äthanol Apigenin-7-β-rutinosid-octaacetat in Form weißer Nadeln vom Schmp. 178 - 180°. Ausbeute: 88 mg (92.9% d.Th.)

$[\alpha]_D^{22} = -46.7^\circ$ (c = 0.85 in Chloroform)

$C_{43}H_{46}O_{22}$ (914.9) ber. C 56.45 H 5.05 8 CH_3CO 37.6
gef. C 56.30 H 4.93 CH_3CO 36.5

KMR-Spektrum ($CDCl_3$, int. TMS) (IXa):
Acetyl: δ = 1.9 - 2.2 ppm (18 - 19 Protonen);
2.3 - 2.5 ppm (6 Protonen, C-5, C-4'-Acetyl);
Aglykon: H-3: δ = 6.6 ppm; H-6: δ = 6.7 ppm (D, J = 2.5 cps);
H-8: δ = 7.0 ppm (D, J = 2.5 cps);
H-3',5': δ = 7.3 ppm (D, J = 9 cps);
H-2',6': δ = 7.92 ppm (D, J = 9 cps);
Rhamnoglucosyl: Rhamnose-CH_3: δ = 1.25 ppm (D, J = 6 cps);
Glucose-H-5,6,6 und Rhamnose-H-5:
δ = 3.8 ppm (4 Protonen);
Glucose-H-1,2,3,4 und Rhamnose-H-2,3,4:
δ = 5.2 - 5.4 ppm (7 Protonen);
Rhamnose-H-1: δ = 4.75 ppm (D, J = 1 cps).

Chromatographie:
Kieselgelplatte, Äther-Toluol (2:1)
Apigeninrutinosidacetat R_f 0.22
Rhoifolinacetat R_f 0.17
Schwarzgrünfärbung mit H_2SO_4 bei 150°

3. Dehydrierung von Poncirin zu Fortunellin

a) 0.504 g Poncirinheptaacetat (IVa) wurden in 4 ml Eisessig gelöst und mit 1 ml Acetanhydrid, 0.50 g Kaliumacetat und 0.26 g Jod versetzt. Nach 21-stündigem Erhitzen unter Rückfluß tropften wir die erkaltete Lösung in 100 ml 0.5%, eisgekühlte Kaliumjodid-Lösung. Nach unter Linarin beschriebener Reinigung des Dehydrierungsproduktes und 25-minütigem Entacetylieren mit 70 ml 1.8 n Natriummethylatlösung bei 0° erhielten wir aus wässrigem Methanol gelbliche Nadeln von Acacetin-7-neohesperidosid. Nach Klären mit Kohle und Umkristallisieren erhielten wir 0.208 g chromatographisch reines Fortunellin (X) vom Schmp. 213 - 215°, entsprechend 60.1% d.Th.. Durch mehrmaliges Umkristallisieren aus verdünntem Methanol erhöhte sich der Schmp. auf 219 - 220°. Aus wässrigem Pyridin erhielten wir isomorphe, hellgelbe Nadeln vom Schmp. 237 - 240°, die nach Umkristallisieren aus verdünntem Methanol wieder bei 219 - 220° schmolzen. Lit.[117]: Schmp. 215°.

$[\alpha]_D^{24} = -102.8^{\circ}$ (c = 0.87 in Pyridin)

$C_{28}H_{32}O_{14} \cdot H_2O$ (610.6) ber. C 55.13 H 5.66 1 OCH_3 5.08
gef. C 55.18 H 5.49 OCH_3 5.43

UV λ_{max} (log ε) 269 mμ (4.29) 329 mμ (4.34) (Methanol)

KMR-Spektrum auf Seite 68

Chromatographie: siehe Seite 130/131

b) 0.113 g Fortunellin (X) wurden, wie unter Apigeninrutinosid beschrieben, acetyliert und aufgearbeitet. Wir erhielten 0.160 g Fortunellinheptaacetat (Xa) vom Schmp. 131 - 133°, entsprechend einer Ausbeute vom 97.3%.

$[\alpha]_D^{29} = -49.0^{\circ}$ (c = 0.84 in Chloroform)

$C_{42}H_{46}O_{21}$ (886.8) ber. C 56.83 H 5.23 7 CH_3CO 33.9
gef. C 57.05 H 5.40 CH_3CO 33.75

KMR-Spektrum ($CDCl_3$, int. TMS) (Xa):

Acetyl: δ = 1.98 - 2.22 ppm (18 Protonen);
2.45 ppm (3 Protonen, C-5-Acetyl);
Aglykon: H-3: δ = 6.6 ppm;
H-6: δ = 6.75 ppm (D, J = 2.5 cps);
H-8, H-3', H-5': δ = 6.9 - 7.2 ppm;
H-2', H-6': δ = 7.9 ppm (D, J = 9 cps)
Rhamnoglucosyl: Rhamnose-CH_3: δ = 1.25 ppm (D, J = 6 cps);
Glucose-H-2,5,6,6, Rhamnose-H-5 und 4'-Methoxyl: δ = 3.85 - 4.4 ppm (5 + 3 Protonen);
Glucose-H-1,3,4 und Rhamnose-H-1,2,3,4:
δ = 5.0 - 5.6 ppm (7 Protonen).

Chromatographie:
Kieselgelplatte, Äther-Toluol (2:1)
R_f-Wert 0.16; Schwarzgrün mit H_2SO_4 bei 150°

4. Dehydrierung von Naringin zu Rhoifolin

a) 0.600 g Naringinacetat wurden in 6 ml Eisessig gelöst und mit 0.6 g Kaliumacetat, 1.5 ml Acetanhydrid und 0.3 g Jod 15 Stdn. am Rückfluß erhitzt. Nach unter Linarin beschriebener Reinigung und 15-minütigem Entacetylieren mit 15 ml 1.8 n Natriummethylatlösung erhielten wir aus wässrigem Methanol gelbliche Nadeln von rohem Apigenin-7-neohesperidosid. Nach Reinigen mit Kohle und Umkristallisieren aus wässrigem Pyridin erhielten wir reines, fast weißes Rhoifolin (XI) vom Schmp. 200 - 205°. Der Schmelzpunkt erhöhte sich durch mehrmaliges Umkristallisieren aus wässrigem Pyridin und zuletzt aus Methanol auf 202 - 205°. Lit.[125]: 200 - 205°. Ausbeute: 0.18 g (47.6% d.Th.).
Das bei 150° im Hochvakuum getrocknete Glykosid enthält nach Karl Fischer 1/2 Mol H_2O (ber. 1.5%, gef. 1.2%).

$[\alpha]_D^{29}$ = -118.7° (c = 1.07 in Methanol)

$C_{27}H_{30}O_{14} \cdot 1/2\ H_2O$ (587.5)

ber. C 55.19 H 5.32
gef. C 55.12 H 5.25

UV λ_{max} (log ε) 268 mμ (4.23) 336 mμ (4.30) (Methanol)

Chromatographie: siehe Seite 132

b) 0.60 g Rhoifolin (XI) wurden wie üblich acetyliert. Aus Äthanol kristallisierten weiße, kräftige Nadeln von Rhoifolinoctaacetat (XIa). Schmp.: 220 - 224°. Lit.[135]: Schmp. 215 - 217°. Ausbeute: 0.871 g (92% d.Th.).

$[\alpha]_D^{27}$ = -47.2 (c = 1.43 in Chloroform)

$C_{43}H_{46}O_{22}$ (914.9) ber. C 56.45 H 5.05 8 CH_3CO 37.64
gef. C 56.50 H 5.04 CH_3CO 37.77

KMR-Spektrum ($CDCl_3$, int. TMS) (XIa):
Acetyl: δ = 1.9 - 2.2 ppm (18 Protonen);
2.35 - 2.50 ppm (6 Protonen, C-5, C-4' Acetyl);
Aglykon: H-3: δ = 6.62 ppm; H-2',6' δ = 7.82 ppm (D, J = 9 cps);
H-6: δ = 6.72 ppm (D, J = 2.5 cps);
H-8: δ = 7.05 ppm (D, J = 2.5 cps);
H-3',5': δ = 7.30 ppm (D, J = 9 cps);
Rhamnoglucosyl: Rhamnose-CH_3: δ = 1.22 ppm (D, J = 6 cps);
Glucose-H-2,5,6,6 und Rhamnose-H-5:
δ = 3.9 - 4.3 ppm (5 Protonen);
Glucose-H-1,3,4 und Rhamnose-H-1,2,3,4:
δ = 5.05 - 5.45 ppm (7Protonen).

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1) N.KOCHETKOV und A.KHORLIN, Arzneimittelforschung 16, 101 (1966)
2) L.MALAPRADE, Bull.Soc.Chim.France 39, 325 (1926)
3) W.MACLAY, R.HANN u. C.HUDSON, J.Am.Chem.Soc. 61, 1660 (1939)
4) M.ABDEL-AKHER, J.HAMILTON, R.MONTGOMERY u. F.SMITH, J.Am.Chem.Soc. 74, 4970 (1952)
5) C.BISHOP u. F.COOPER, Can.J.Chem. 38, 793 (1960)
6) T.SERGIENKO, L.KAZARNOVSKII u. V.LITVINEKO, Khim.Prirodn. Soedin., Akad.Nauk Uz.SSR 2, 166 (1966)
7) R.CRIEGEE, Chem.Ber. 64, 260 (1931)
8) A.PERLIN, Advances in Carb.Chem. 14, 9 (1959)
9) A.PERLIN, Can.J.Chem. 34, 451 (1956)
10) J.SHIBUYA u. A.BENSON, Nature 192, 1186 (1961)
11) P.FINAN, R.REED u. W.SNEDDEN, Chem.and Ind.(London) 1172 (1958)
12) N.KOCHETKOV u. O.CHIZHOV, Advances in Carb.Chem. 21, 39 (1966)
13) C.USOV, Report at IX. Meeting of Mendeleev Society of the Uz. SSR, Kiev, 1965, ref.Advances in Carb.Chem. 21, 39 (1966)
14) N.KOCHETKOV u. O.CHIZHOV, Tetrahedron 21, 2029 (1965)
15) N.KOCHETKOV u. OCHIZHOV, Intern.Symp.Chem.Nat.Prod., IV, Stockholm, Juni 1966
16) R.BAILEY u. I.PRIDHAM, Advances in Carb.Chem. 17, 121 (1962)
17) R.REEVES u. F.BLOUIN, J.Am.Chem.Soc. 77, 2261 (1957)
18) L.JANICKE, Naturw. 39, 86 (1952)
19) H.RÖSLER, Dissertation München 1960
20) B.GENTILI u. R.HOROWITZ, Bull.Nat.Inst.Science India 31, 78(1965)
21) C.SWEELEY, R.BENTLEY, M.MAKITA u. W.WELLS, J.Am.Chem.Soc. 85, 2497 (1963)
22) R.FERRIER, Chem.and Ind.(London) 831 (1961)
23) K.WALLENFELS, Naturw. 37, 491 (1950)
24) R.BAILEY, J.Chromatog. 4, 206 (1960)
25) H.KILIANI, Chem.Ber. 63, 2866 (1930)
26) T.TIMELL, Can.J.Chem. 42, 1456 (1964)
27) F.PERCHERON, C.R.hebd.Acad.Sci. 261, 4544 (1965)
28) P.LIST, Archiv d.Pharm. 298, 107 (1965)
29) T.PAINTER, Can.J.Chem. 37, 497 (1959)
30) C.CHARAUX, C.R.hebd.Acad.Sci. 178, 1312 (1924)
31) G.ZEMPLEN u. A.GERECS, Chem.Ber. 71B, 2520 (1938)
32) R.TSCHESCHE u. G.WULFF, Tetrahedron 19, 621 (1963)
33) B.CHANDLER u. K.HARPER, Austral.J.Chem. 14, 586 (1961)
34) G.ZEMPLEN u. R.BOGNAR, Chem.Ber. 75, 482 (1942)
35) C.BALLOU, Advances in Carb.Chem. 9, 59 (1954)
36) R.HOROWITZ u. B.GENTILI, Tetrahedron 19, 773 (1963)
37) C.McCLOSKEY u. G.COLEMAN, J.Org.Chem. 10, 184 (1955)
38) W.KLYNE, Biochem.J. 47, xli (1950)
39) H.SPEDDING, Adv.Carbohydr.Chem. 19, 23 (1964)
40) L.HALL, Adv.Carbohydr.Chem. 19, 51 (1964)
41) T.PURDIE u. J.IRVINE, J.Chem.Soc.(London) 83, 1021 (1903)
42) W.HAWORTH, J.Chem.Soc.(London) 107, 8 (1915)
43) R.KUHN, H.TRISCHMANN u. I.LÖW, Angew.Chem. 67, 32 (1955)
44) K.WALLENFELS, G.BECHTLER, R.KUHN, H.TRISCHMANN u. H.EGGE, Angew.Chem. 75, 1014 (1963)
45) W.HAWORTH u. G.LEITCH, J.Chem.Soc.(London) 115, 809 (1919)

46) R.KUHN, H.EGGE, R.BROSSMER, A.GAUHE, P.KLESSE, W.LOCHINGER, R.RÖHM, H.TRISCHMANN u. D.TSCHAMPEL, Angew.Chem. 72, 805 (1960)
47) N.KORNBLUM, R.SELTZER u. P.HABERFIELD, J.Am.Chem.Soc. 85, 1148 (1963)
48) W.CHARLTON, W.HAWORTH u. W.HICKINBOTTOM, J.Chem.Soc.(London) 1527 (1927)
49) W.HAWORTH u. E.HIRST, J.Chem.Soc.(London) 119, 193 (1921)
50) S.HAKOMORI, J.Biochem.(Japan) 55, 205 (1964)
51) E.COREY u. CHAYKOVSKY M., J.Am.Chem.Soc. 84, 866 (1962)
52) H.RICHTER, J.Chem.Soc.(London) 1701 (1936)
53) K.CHRISTIANSEN u. P.BOLL, Planta Medica 77 (1964)
54) K.HEIN, Dissertation München 1965
55) W.HAWORTH, J.Chem.Soc.(London) 117, 199 (1920)
56) N.KOCHETKOV, A.KHORLIN, V.VAS'KOVSKII u. I.GUDKOVA, J.Akad. Nauk.Uz.SSR S.Khim. 1177 (1965)
57) T.NAKABAYASHI, J.Agric.Chem.Soc.Japan 35, 942 (1961)
58) C.SRIVASTAVA u. G.ADAMS, Can.J.Chem. 40, 1415 (1962)
59) M.GEE, Anal.Chem. 35, 350 (1963)
60) R.TSCHESCHE , J.Chromatog. 12, 342 (1963)
61) A.McINNES, D.BALL, F.COOPER u. C.BISHOP, J.Chromatog. 1, 556 (1958)
62) H.KIRCHER, Anal.Chem. 32, 1103 (1960)
63) C.BISHOP, Methods Biochem.Anal. 10, 1 (1962)
64) M.GEE u. H.WALKER, Anal.Chem. 34, 650 (1962)
65) C.BISHOP, Adv.Carbohydr.Chem. 19, 95 (1964)
66) C.BISHOP u. F.COOPER, Can.J.Chem. 38, 388 (1960)
67) F.BROWN, E.HIRST, L.HOUGH, J.JONES u. H.WADMAN, Nature 161, 720 (1948)
68) H.JONES u. M.PERRY, Can.J.Chem. 40, 1339 (1962)
69) E.BAYER u. R.WIDDER, Anal.Chem. 36, 1452 (1964)
70) G.ASPINALL, J.Chem.Soc.(London) 1676 (1963)
71) S.HATTORI, M.HASEGAWA u. M.SHIMOKORIYAMA, Acta Phytochim.Tokyo 14, 1 (1944)
72) S.HATTORI, Acta Phytochim.Tokyo 4, 219 (1929)
73) J.SHINODA u. S.SATO, J.Pharm.Soc.Japan 48, 109 (1928)
74) R.HOROWITZ u. B.GENTILI, Arch.Biochem.Biophys. 92, 191 (1961)
75) W.DUNLAP u. S.WENDER, Arch.Biochim.Biophys. 87, 228 (1960)
76) W.DUNLAP u. S.WENDER, Anal.Biochem. 4, 110 (1962)
77) J.MIZELLE, W.DUNLAP, R.HAGEN, S.WENDER, B.LIME, R.ALBACH u. F.GRIFFITHS, Anal.Biochem. 12, 316 (1965)
78) C.BRIESKORN u. G.MEISTER, Arch.Pharm. 298, 435 (1965)
79) D.FOX, W.SAVAGE, S.WENDER, J.Am.Chem.Soc. 75, 2504 (1953)
80) H.PACHECO u. A.GROUILLER, Bull.Soc.Chim.France 2937 (1965)
81) C.HUDSON, J.Am.Chem.Soc. 38, 1566 (1916)
82) G.ZEMPLEN u. A.GERECS, Chem.Ber. 67, 2049 (1934); 68, 1318(1935)
83) P.GORIN u. A.PERLIN, Can.J.Chem. 37, 1930 (1959)
84) M.HASEGAWA u. T.SHIRATO, J.Am.Chem.Soc. 77, 3557 (1955)
85) H.RÖSLER, T.MABRY u. J.KAGAN, Chem.Ber. 98, 2193 (1965)
86) G.ZEMPLEN u. R.BOGNAR, Chem.Ber. 76, 773 (1943)
87) E.PASCU, J.Am.Chem.Soc. 52, 2571 (1937)
88) J.SHINODA u. S.SATO, J.Pharm.Soc. 48, 117 (1928) (Japan)
89) W.WILL, Chem.Ber. 18, 1311 (1885)
90) DE VRY 1857, E.HOFFMANN, Arch.Pharm. 214, 139 (1879)

91) S.KAMIYA, S.ESAKI u. M.HAMA, Agr.Biol.Chem.Japan 31, 402 (1967)
92) M.HASEGAWA u. T.SHIRATO, J.Am.Chem.Soc. 74, 6114 (1952)
93) J.MIZELLE, W.DUNLAP u. S.WENDER, Phytochemistry 6, 1305 (1967)
94) R.HOROWITZ, B.GENTILI u. E.HAND, IUPAC-Kyoto (Japan) Abstracts of Papers, S. 158 (1964)
95) S.KAMIYA, S.ESAKI u. M.HAMA, Agr.Biol.Chem.Japan 31, 261 (1967)
96) B.KOEPPEN, Tetrahedron Letters 1968, 2393
97) E.FISCHER u. M.BERGMANN u. A.RABE, Chem.Ber. 53, 2372 (1920)
98) M.WOLFROM U.A.THOMPSON, Methods in Carbohydr.Chem. Band 2, S. 211 Academic Press New York u. London (1963)
99) R.LEMIEUX u. J.HOWARD, Methods in Carbohydr.Chem. Band 2, S.400 Academic Press New York u. London (1963)
100) R.LEMIEUX u. G.HUBER, Can.J.Chem. 31, 1040 (1953)
101) B.HELFERICH u.J.ZIRNER, Chem.Ber. 95, 2604 (1962)
102) J.Chopin u. G.DELLAMONICA, C.R.hebd.Acad.Sci. C 262 1712 (1966)
103) L.HOUGH u. R.THEOBALD, Methods in Carbohydr.Chem. Band 2, S.162 Academic Press New York u. London (1963)
104) E.KÖNIGS u. L.KNORR, Chem.Ber. 34, 974 (1901)
105) F.CANTER, F.CURD u. R.ROBERTSON, J.Chem.Soc. (London) 1245(1931)
106) G.ZEMPLEN, R.BOGNAR, Chem.Ber. 75, 645 (1942)
107) M.SHIMOKORIYAMA, Bot.Mag.Tokyo 79, 602 (1966)
108) A.PERKIN, J.Chem.Soc.(London) 77, 423 (1900)
109) SCHLAGDENHAUFFEN u. REEB, C.R.hebd.Acad.Sci. 138, 763 (1904)
110) T.KLOBB u. A.FANDRE, C.R.hebd.Acad.Sci. 145, 331 (1907)
111) M.YÜ, Bull.Soc.Chim.Biol. 15, 482 (1933)
112) W.BAKER, R.HEMMING u. W.OLLIS, J.Chem.Soc.(London) 691 (1951)
113) K.MERZ u. Y.WU, Arch.Pharm. 274, 126 (1936)
114) G.ZEMPLEN u. R.BOGNAR, Chem.Ber. 74, 1818 (1941)
115) S.HATTORI, Acta Phytochim.Tokyo 2, 99 (1925)
116) G.ZEMPLEN u. L.MESTER, Magyar Kém.Folyoirat 56, 2 (1950)
117) T.MATSUNO, J.Pharm.Soc.Japan 78, 1311 (1958)
118) S.v.KOSTANECKI, R.LEVI u. J.TAMBOR, Chem.Ber. 32, 326 (1899)
119) G.ZEMPLEN u. R.BOGNAR, Chem.Ber. 76, 452 (1943)
120) N.LORETTE, T.GAGE u. S.WENDER, J.Org.Chem. 16, 930 (1951)
121) V.MAHESH u. T.SESHADRI, J.Sci.Ind.Research (India) 14B, 608 (1955)
122) V.PLOUVIER, C.R.hebd.Acad.Sci.Ser.D 262, 1368 (1966)
123) N.NARASIMHACHARI u. T.SESHADRI, Proc.Ind.Acad.Sci. 30A, 151(1949)
124) E.GELLA, G.MAKAROVA, Y.BORISYNK u. V.LITVINENKO, Farmatsevt.Zh. (Kiev) 21, 58 (1966); ref. C.A. 65, 13810e (1966)
125) S.HATTORI u. H.MATSUDA, Arch.Biochem.Biophys. 37, 85 (1952)
126) S.HATTORI, M.SHIMOKORIYAMA u. M.KANAO, J.Am.Chem.Soc., 74, 3614 (1952)
127) S.HATTORI u. M.SHIMOKORIYAMA, Sci.Proc.Roy.Dublin Soc. 27, 139 (1956)
128) W.KARRER, "Konstitution und Vorkommen der Organ.Pflanzenstoffe, Birkäuser Verlag Basel/Stuttgart (1958)
129) J.B.HARBORNE, "Comparative Biochemistry of the flavonoids", Academic Press, London u. New York (1967)
130) R. BAILEY, "Oligosaccharides", Pergamon Press, Oxford (1965)
131) T.NAKAOKI, N.MORITA u. Y.YOSHIDA, J.Pharm.Soc.Japan 77, 112 (1957)

132) V.PLOUVIER, C.R.hebd.Acad.Sci. D 263, 1529 (1966)
133) J.COUSSIO, An.Asoc.Quim.Argent. 53, 257 (1965)
134) M.UASUE, M.ITAYA, M.INAGAKI, H.KATAYAMA u. N.KAWAMURA, Yakugaku Zasshi 87, 47 (1967)
135) H.RÖSLER, T.MABRY, F.CRANMER u. J.KAGAN, J.Org.Chem. 30 4346 (1965)
136) B.KOEPPEN, J.Chromatog. 18, 604 (1965)
137) R.HOROWITZ in "Biochemistry of Phenolic Compounds" (herausgeg. von J.HARBORNE) S. 545-572, Academic Press London u. New York (1964)

L e b e n s l a u f

Am 8. September 1939 wurde ich, Gerold Aurnhammer, als Sohn des damaligen Reichsbahnrates Georg Aurnhammer und seiner Ehefrau Eugenie, geb. Führer, in Greiz/Thüringen geboren. Bedingt durch mehrfachen Wohnsitzwechsel meiner Eltern, verbrachte ich die Kindheit in Zoppot bei Danzig und besuchte nach der Vertreibung bei Kriegsende mehrere Schulen in Bayern. Nach vierjähriger Volksschulzeit in Simmerberg/Allgäu und Oberschondorf/Ammersee (1945 - 1949) besuchte ich ein halbes Jahr lang das Gymnasium in Weilheim, trat 1950 in das St.Anna-Gymnasium in Augsburg ein, kam 1951 an das Augsburger Realgymnasium und wechselte 1956 an das Wittelsbacher Gymnasium (Realgymnasium) in München über. Im Juni 1959 legte ich dort die Reifeprüfung ab.

Als Apothekerpraktikant arbeitete ich von November 1959 bis September 1961 in der Dante-Apotheke in München. Ab November 1961 studierte ich an der Universität München zuerst Naturwissenschaften, dann Pharmazie und legte dort im November 1965 das pharmazeutische Staatsexamen ab.

Im Herbst 1965 begann ich am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München mit der Ausarbeitung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Herrn Professor Dr. H. Wagner.